UNIVERSITÉ DE LIÈGE
BELGIQUE

VOL. 28 1961-1962

UNIVERSITY OF ARIZONA
AUG 10 1962
LIBRARY

ARCHIVES

DE

L'INSTITUT DE BOTANIQUE,

DE LA

STATION D'ÉCOLOGIE VÉGÉTALE DES HAUTES-FAGNES

ET DU

LABORATOIRE DU PHYTOTRON (I.R.S.I.A.)

sous la direction

du Professeur R. BOUILLENNE

SOMMAIRE

PHYSIOLOGIE VEGETALE

1. M. BOUILLENNE-WALRAND. Action de la Gibbérelline sur la floraison de plantes horticoles.

2. M. BOUILLENNE-WALRAND. Concerning the response of dwarf mutants of *Zea Maïze* to applications of Gibberelic acid.

3. C.M. BACQ et G. BERNIER. La pénétration et la localisation des ions Ca^{**} et PO_4 chez *Raphanus sativus* L. et *Sinapis alba* L.

4. M. BOUILLENNE-WALRAND et R. BOUILLENNE. Evaluation des teneurs en Chlorophylles et Vitamines des grains d'Orge secs ou germés, pendant 6 jours, sur solution minérale nutritive et sous lumière artificielle des tubes Phytor C.R.H.Lg.

5. Th. GASPAR. Photopériodisme et intensité lumineuse chez *Salvia splendens* L. var. Feu de la Saint-Jean.

6. G. BERNIER. Etude anatomique et histochimique des racines d'*Eminia* TAUB.

7. G. BERNIER. Ontogénie du méristène apical de *Sinapis alba* L. (Cruciféracées) depuis la graine jusqu'à l'édification de l'inflorescence.

580.6
L71 v.28

8. M. BOUILLENNE-WALRAND, J. KHALADJI et G. WETROFF. Sur les propriétés antibiotiques du Trichlorex et la réalisation de sa synthèse.
   I. Les étapes de la découverte du Trichlorex.
   II. Extraction du Trichlorex — Essais de purification — Mesures de toxicité sur végétaux inférieurs des produits isolés.
   III. Purification, analyse, structure moléculaire et synthèse du Trichlorex.
9. R.M.M. CRAWFORD. Morphological and metabolic changes in the apical bud with relation to photoperiodism in *Salvia splendens* (Changements morphologiques et métaboliques dans le bourgeon apical en relation avec le photopériodisme chez *Salvia splendens*.)

PHYTOSOCIOLOGIE ET ECOLOGIE VEGETALE

10. R. SCHUMACKER. Etude d'une tourbe à *Scheuzeria palustris* dans les couches inférieures des dépôts de la Fagne wallonne.
11. J. MOUREAU. Les Cordyceps du Congo.
12. J. MOUREAU. Nouveaux Cordyceps du Congo.
13. G. BERNIER. L'aire de dispersion du genre *Eminia* TAUB (Munkoyo) et l'origine de son utilisation chez les Bantus.
14. G. BERNIER. Les végétaux dans la vie quotidienne des populations rurales du Haut Katanga.

CORRESPONDANCES ET ECHANGES

Pour tout ce qui concerne les **Archives de l'Institut de Botanique de l'Université de Liège,** nous vous demandons de vouloir bien envoyer la correspondance à l'adresse suivante :

M. le Secrétaire des
Archives de l'Institut de Botanique
de l'Université de Liège
3, rue Fusch, Liège
(Belgique).

UNIVERSITÉ DE LIÈGE
BELGIQUE

VOL. 28 1961-1962

ARCHIVES

DE

L'INSTITUT DE BOTANIQUE,

DE LA

STATION D'ÉCOLOGIE VÉGÉTALE DES HAUTES-FAGNES

ET DU

LABORATOIRE DU PHYTOTRON (I.R.S.I.A.)

sous la direction

du Professeur R. BOUILLENNE

SOMMAIRE

PHYSIOLOGIE VEGETALE

1. M. BOUILLENNE-WALRAND. Action de la Gibbérelline sur la floraison de plantes horticoles.

2. M. BOUILLENNE-WALRAND. Concerning the response of dwarf mutants of *Zea Maïze* to applications of Gibberelic acid.

3. C.M. BACQ et G. BERNIER. La pénétration et la localisation des ions Ca^{**} et PO_4 chez *Raphanus sativus* L. et *Sinapis alba* L.

4. M. BOUILLENNE-WALRAND et R. BOUILLENNE. Evaluation des teneurs en Chlorophylles et Vitamines des grains d'Orge secs ou germés, pendant 6 jours, sur solution minérale nutritive et sous lumière artificielle des tubes Phytor C.R.H.Lg.

5. Th. GASPAR. Photopériodisme et intensité lumineuse chez *Salvia splendens* L. var. Feu de la Saint-Jean.

6. G. BERNIER. Etude anatomique et histochimique des racines d'*Eminia* TAUB.

7. G. BERNIER. Ontogénie du méristène apical de *Sinapis alba* L. (Cruciféracées) depuis la graine jusqu'à l'édification de l'inflorescence.

8. M. BOUILLENNE-WALRAND, J. KHALADJI et G. WETROFF. Sur les propriétés antibiotiques du Trichlorex et la réalisation de sa synthèse.
   I. Les étapes de la découverte du Trichlorex.
   II. Extraction du Trichlorex — Essais de purification — Mesures de toxicité sur végétaux inférieurs des produits isolés.
   III. Purification, analyse, structure moléculaire et synthèse du Trichlorex.
9. R.M.M. CRAWFORD. Morphological and metabolic changes in the apical bud with relation to photoperiodism in *Salvia splendens* (Changements morphologiques et métaboliques dans le bourgeon apical en relation avec le photopériodisme chez *Salvia splendens*.)

PHYTOSOCIOLOGIE ET ECOLOGIE VEGETALE

10. R. SCHUMACKER. Etude d'une tourbe à *Scheuzeria palustris* dans les couches inférieures des dépôts de la Fagne wallonne.
11. J. MOUREAU. Les Cordyceps du Congo.
12. J. MOUREAU. Nouveaux Cordyceps du Congo.
13. G. BERNIER. L'aire de dispersion du genre *Eminia* TAUB (Munkoyo) et l'origine de son utilisation chez les Bantus.
14. G. BERNIER. Les végétaux dans la vie quotidienne des populations rurales du Haut Katanga.

CORRESPONDANCES ET ECHANGES

Pour tout ce qui concerne les **Archives de l'Institut de Botanique de l'Université de Liège,** nous vous demandons de vouloir bien envoyer la correspondance à l'adresse suivante :

M. le Secrétaire des
Archives de l'Institut de Botanique
de l'Université de Liège
3, rue Fusch, Liège
(Belgique).

OVERDRUK UIT MEDEDELINGEN VAN DE LANDBOUWHOGESCHOOL EN DE OPZOEKINGSSTATIONS VAN DE STAAT TE GENT. 1960. DEEL XXV. Nº 3-4

CONCERNING THE RESPONSE OF DWARF MUTANTS OF ZEA MAIZE TO APPLICATIONS OF GIBBERELLIC ACID. GIBBERELLIN AND AUXIN (b indol-acetic acid — I.A.A.)

by

M. Bouillenne-Walrand

Sous-Directeur du Centre de Recherches des Hormones Végétales (I.R.S.I.A.)
LIÈGE

In our report to the XIth Symposium of Phytopharmacy and Phytiatry (1959), we showed that gibberellin applied in spray onto the leaves, or in drops in the cornet of the leaves of young plants of ordinary Maize (*Zea Maize*, W 240 hybride double) had the effect of *momentarily* increasing the percentages of free and combined I.A.A. in the leaves treated, and provoking a considerable increase in the size and in the fresh, dry weights of the plants treated.

The increase in the percentage of I.A.A. in plants treated with gibberellin and liable to react to the growth actions of this-compound seems well established today.

Writers are agreed that the explanation of this increase in the percentage of I.A.A. is as follows : the gibberellin hinders or interrupts the activity of the I.A.A.-oxidase, which controls the level of free auxin existing naturally in the tissues.

In short, the gibberellin in this case would act like certain phenolic bodies (ferulic acid or 3 methoxy-4-hydroxycinamic) which are already known as inhibitors of I.A.A. oxidase (Gortner, 1958), and its action would be synergic with that of I.A.A. (Galston and all., 1959).

Some workers (D. C. McCune and A. W. Galston, 1959) propose that the hindering of peroxydase by gibberellin is involved in the growth phenomena, the dwarf varieties having in general more peroxydase than the normal varieties of the same type (Kamerbeek G. A., 1956).

However, there are cases where the action of gibberellin and I.A.A. added at the same time is either merely additive, or even competitive (Purves and all., 1958), and it is not impossible that the biochemical reactions of growth due to gibberellin

and those due to I.A.A. are totally independent. We have already discussed this point (Bouillenne, 1959).

The study of dwarf mutants (Maize, Peas, Beans, etc.) may throw some light on these discussion points. Certain dwarf mutants contain I.A.A. in measurable quantities. However, they remain dwarf, even if given extra I.A.A. The I.A.A. alone does not abolish dwarfing. Some react to gibberellin by considerable growth which brings them to normal size, whilst other mutants of the same species do not react either to I.A.A. or to gibberellin.

In the first case, it is clear that gibberellin plays a different role from that of a mere protector of I.A.A., since the latter alone is not able to promote a growth effect, whatever its concentration. It is more likely that there is a gibberellin-I.A.A. synergy, or even a dependence of gibberellin on I.A.A. (Galston) or vice-versa, should it be proved that substances of a gibberellic nature exist everywhere where there is growth.

In the second case, it has to be admitted that these mutants control a biochemical reaction foreign to the I.A.A.-gibberellin system and necessary for the metabolism of growth (for example, that of the ribonucleic system) or that the concentrations of I.A.A. in these dwarfs are too weak to permit the interaction auxin-gibberellin.

We had the opportunity to make use of a series of *dwarf Maize* plants which had been used by B. O. Phinney and Ch. West (1956) for their experiments on „dwarfing genes" which control the different stages of the growth metabolism.

TABLE I

Percentage of normal plants and dwarf plants in the different series of Maize

N⁰ of the series	Genetic origin (Phinney)	Percentage of	
		normal	dwarf
1	3N.1d5 — 158	83	17
2	3N.1d5 — 168	75	25
3	3N.1d5 — 211	87	13
4	3N.1d5 — 230	93	7
5	3N.1d5 — 232	68	32
6	3N.1d5 — 240	66	34
7	Dominant dwarf. A — seed open	50	50
8	Dominant dwarf. B — seed open	50	50
9	Segregating 5N.1d1 A	72	28
10	Segregating 5N.1d1 B	56	44
11	Segregating 5N.1d1 C	60	40
12	Segregating 5N.1d1 D	80	20
13	Segregating 5N.1d1 E	72	28
14	Segregating 5N.1d1 F	93	7

In the 14 series we received, the tendency to dwarfing is fairly variable; in each serie, the percentage of dwarf plants observed one month after sowing, is as follows : (see table I).

The dwarf plants of each series were then divided into two groups : one lot was kept as reference plants and the other lot was treated three times (on the 5th-12th-16th January 1960) with gibberellic acid (at 0.01%, at the dose of 100 gamma per plant) (*)

34 days after the last application of auxin, the plants were examined and the table of biometric measures drawn up. (These results will be published later).

Only the dwarf plants of the treated series 7 and 8 remained dwarf; in all other cases, the dwarf plants began to grow and gradually assumed the appearance of normal sized plants.

The plants which remained dwarf were treated a 4th time with gibberellin (i.e. on February 4th 1960), but without result. On February 27th 1960, i.e. 24 days after the last application, all these plants remained dwarf.

We took off sample homologous leaves (the last but one from the top) on the different plants of the different series, and carried out measurements of auxin (**) according to the method used at the Botanical Institute (Bronchart, R. 1957).

Table II shows the results obtained.

It can be seen that the *dwarf Maize* plants which respond positively to applications of gibberellin, normally contain approximately the same quantities of I.A.A. as normal plants of the same origin. Hence it is not, as might be supposed, a lack of I.A.A. that determines dwarfing in this case. It might be the shortage of a compound known to the Americans as „Gibberellin-like substances" (Phinney, 1956) existing in the young seeds or young fruits, and which has all the chemical appearances of a compound structurally resembling the gibberellin group, the physiological growth properties of which it possesses, moreover. This hypothesis has to be checked.

The existence of gibberellic compounds as normal micro-constituants of superior organisms justifies our interpretation of our results as a confirmation that auxin (I.A.A.)-gibberellin constitute a single functional system, both constituants of which are necessary to growth.

In the dwarfs which resist the action of gibberellin, there is a small quantity of I.A.A. The application of gibberellin slightly

(*) Kindly supplied by the firm Abbott Universal Ltd.

(**) The measurements of auxin were carried out by Miss Leigh, assistant at the Centre de Recherches des Hormones Végétales.

TABLE II

Concentrations of free and combined I.A.A. expressed in per kg. of fresh matter of Maize either treated or untreated with gibberellin (gibberellic acid)

N⁰ of the series	Number of days after the last treatment	State of the plants before treatment	Concentrations of auxin in per kg. of fresh weight		State of plants at time of sampling (in cm)
			free	combined	
Reference Untreated Series 12 to 14	34 days	normal size	12.1	5.4	53 normal
Treated Series 12 to 14	34 days	normal size	8.7	4.9	82
Reference dwarfs Series 9 to 14	34 days	dwarf	13.4	5.8	20 dwarf
Treated dwarfs Series 9 to 14	34 days	dwarf	19.5	—	35 normal aspect
Reference dwarfs Series 7 and 8	23 days	dwarf	2.9	2.9	± 20 dwarf
Treated dwarf Series 7 and 8	23 days	dwarf	5.7	4.5	± 18 dwarf
Normal references Series 7 and 8	23 days	normal			55
Normal treated Series 7 and 8	23 days	normal			80

increases the level of auxin. However, the fact that these dwarfs do not react either to an external supply of I.A.A. or to a treatment by extracts of superior plants containing gibberellic compounds (Phinney) implies that, in this case, their genetic deficiency touches a metabolic reaction essential to the phenomenon of growth, but not directly linked with the I.A.A.-gibberellic biochemical chain.

Remarks

It is interesting to note that the normal plants from the series 7-8 which contain the „gibberellin resistants" are of the same size as the plants of the other series (50 cm) ones and that, after

treatment with gibberellin, they also attain similar heights (approx. 80 cm.).

The conclusions of this preliminary research on the percentages of I.A.A. in genetic mutants of Maize are :

1. In the case of mutants which react to gibberellin, the percentages of I.A.A. are not less than those of normal plants of the same issue, which excludes the possibility of attributing dwarfing to a destruction of I.A.A. by an excess of auxin oxidase.
2. In the case of mutants which do not react to gibberellin, the percentages of normal I.A.A. are very much smaller than in the reference plants; the gibberellin slightly increases this percentage of I.A.A. It is possible that there is no growth effect, because the endogenetic auxin exists there at too low a level. However, the uselessness of treatments by I.A.A. does not permit us to attach much value to this hypothesis.

(Recherches subsidiées par l'I.R.S.I.A.).

BIBLIOGRAPHIE

1. BOUILLENNE-WALRAND, M. — Action des gibbérellines sur la croissance et la floraison des végétaux supérieurs. Relations avec l'acide ß indol-acétique. XIème Symposium de Phytopharmacie et Phytiatrie, 1959.
2. BRONCHART, R. — Recherches sur le dosage des auxines. I. Extraction, purification et dosage de l'acide 3 indol acétique. *Bull. Soc. Roy. Sciences, Liège*, n° 4, 1957.
3. McCUNE, D. C. et GALSTON, A. W. — Inverse effects of gibberellin on peroxydase activity and growth in dwarf strains of Peas and Corn. *Plant Physiology*, **34** (4), 416-418, 1959.
4. GALSTON, A. et WARBURG, H. — An analysis of auxin gibberellin interaction in Pea Stem tissues. *Plant Physiology*, **34**, 1, 16-22, 1959.
5. GORTNER, W., KENT, M. J. et SUTHERLAND, G. K. — Ferulic and p. coumaric acids in pine apple tissue as modifiers of pineapple indol-acetic acid oxidase. *Nature*, **181**, 630-361, 1958.
6. KAMERBEEK, G. A. — Peroxydase content of dwarf types and giant types of plants. *Acta Bot. Neerland.*, **5**, 257-263, 1956.
7. PHINNEY, B. O. et WEST, C. A. — The growth response of Single Gene dwarf Mutants of Zea Mays to Gibberellins and Gibberellin — like substances. *Proc. Internat. Genet. Symp.*, **384**, 85, 1956.
8. PURVES, W. K. and HILLMAN, W. G. — Response of pea stem sections to indol-acetic acid, gibberellic acid and sucrose as affected by length and distance from apex. *Physiologia Plantarum*, **11**, 29-35, 1958.

SUMMARY

Dwarf mutant of Zea Mays (provided by Dr Phinney) which react positively to gibberellin contain approximatively as much I.A.A. as the normal plants of the same variety.

Those which do not react to gibberellin contain smaller quantities of I.A.A. and treatment by gibberellin increases very little the I.A.A. concentration.

Bull. Inst. Agron. et Stat. de Rech. de Gembloux-
Hors série- V. II; 1960; p. 724/738-

La pénétration et la localisation des ions Ca^{++} et PO_4^{---} chez Raphanus sativus L. et Sinapis alba L.

par C. M. Bacq et G. Bernier
Assistants à l'Institut Botanique, Université de Liège (Belgique)

Introduction

Les problèmes relatifs à l'absorption des sels minéraux font l'objet d'un grand nombre de travaux. Des mises au point très complètes de la littérature à ce sujet paraissent à peu près chaque année (Epstein et Leggett, 1954 ; Epstein, 1956 ; Gauch, 1957 ; Robertson, 1958 ; Laties, 1959).

Il ressort de l'ensemble des résultats que le passage des ions du milieu extérieur vers l'intérieur d'un végétal se fait selon deux types de processus :

1. des mouvements ioniques *passifs* amenant les ions dans le « free space » des tissus par 2 mécanismes différents :

a) par simple diffusion,

b) par équilibre de Donnan entre les anions cellulaires fixes et les cations mobiles ;

2. un transport ionique *actif* consommant de l'énergie et, par conséquent, lié au métabolisme respiratoire.

D'un autre point de vue, les relations entre l'absorption minérale et le développement ont été approfondies par divers auteurs (voir à ce sujet le revue de la littérature par El Hinnawy, 1956). Les résultats sont fort variables, parfois mêmes contradictoires. La plupart des recherches, dans ce domaine, ont été effectuées soit sur des plantes carencées, soit sur des plantes pourvues d'un excédent de sels et non sur des plantes normales.

Lorsque le Professeur Bouillenne eut décidé d'introduire les techniques radioisotopiques à l'Institut Botanique de l'Université de Liège et au Centre de Recherches des Hormones Végétales de l'I.R.S.I.A., nous avons entrepris, comme recherches préliminaires, une vérification des données de la littérature ainsi que l'examen plus détaillé de certains points particuliers.

Nous avons notamment étudié la localisation précise des ions Ca^{++} et PO_4^{---} au niveau de chaque organe pris séparément, ce qui n'avait

guère été fait précédemment. De plus, nous avons suivi scrupuleusement le développement des plantes durant tout leur cycle vital (1) en n'expérimentant qu'à des stades bien définis. Ces précisions manquent généralement dans les études antérieures.

Les plantes étudiées sont *Sinapis alba* L. (la Moutarde blanche) et *Raphanus sativus* L. (le Radis). Elles sont cultivées en milieu strictement conditionné (Phytotron de l'Université de Liège et de l'I.R.S.I.A.) : Température de l'air : 20° C. et Humidité de l'air : 80 %. La durée journalière de l'éclairement est de 16 heures dans le cas de *Sinapis* (photopériode favorable à la mise à fleur) et de 8 heures dans le cas de *Raphanus* (photopériode favorable à la tubérisation). Les Radis sont cultivés en aquiculture pure, tandis que les *Sinapis* sont cultivés en aquiculture sur gravier.

Nos séries expérimentales ne comptent qu'un petit nombre d'individus, mais ceux-ci ont été sélectionnés pour leur homogénéité à partir de semis beaucoup plus vastes (voir à ce sujet, Went, 1957).

Résultats

I. — Pénétration et localisation de l'ion PO_4^{--} chez Sinapis

I-1. Une dose de 20 μc de $^{32}PO_4$ est mise à la disposition de 20 plantes pendant 24 heures. Cette expérience, reprise à divers stades du développement, donne les résultats suivants :

Tableau I

Activités spécifiques de divers organes après 24 heures en coups/minute/mgr. P_2O_5

	Plantule portant 2 feuilles étalées et 2 feuilles jeunes	Préfloraison (apparition des boutons floraux)	Floraison	Fructification
Cotylédons	349	1687	79	28
Feuille 1	840	2677	163	35
Feuille 3	1089	3310	270	81
Feuille 5	—	2143	392	91
Feuille 7	—	—	480	118
Feuille 9	—	—	—	124
Fleurs	—	—	193	71
Fruits	—	—	—	131
Racines	1720	4219	1638	1142

(1) Dans le cas du radis, nous nous sommes arrêtés à la formation du tubercule.

Il ressort clairement que la vitesse de pénétration de l'ion PO_4 dépend *avant tout de l'étape physiologique* considérée.

Pour chaque organe, *quel que soit son âge propre*, c'est à la préfloraison que l'activité spécifique est maximale. Le cas des feuilles 3 et 5 est typique à cet égard. La feuille n° 3 absorbe davantage lorsqu'elle est adulte (préfloraison) que lorsqu'elle est juvénile (stade plantule), tandis que la feuille n° 5 accumule davantage lorsqu'elle est jeune (préfloraison) qu'à l'état adulte (floraison).

Notons qu'à la préfloraison commence une période de croissance accélérée qu'il convient de mettre en rapport avec cette accumulation maximale.

L'activité spécifique diminue considérablement aux étapes ultérieures : floraison et fructification.

I-2. *Secondairement*, d'autres facteurs influencent la répartition de l'ion, notamment l'âge propre des organes étudiés.

En effet, à un stade donné du développement, ce sont toujours les organes jeunes qui accumulent le plus. A cet effet, il suffit de comparer les activités spécifiques avec le numéro d'apparition des feuilles sur la tige.

I-3. La nature de l'organe conditionne aussi la vitesse d'accumulation de l'ion.

Les racines possèdent, à un stade donné du développement, une radioactivité toujours supérieure à celle de n'importe quel autre organe. Les cotylédons sont toujours les organes les moins métaboliques au point de vue du renouvellement de leur contenu en phosphore.

II. Pénétration, Localisation et Redistribution de l'ion Ca^{++} chez Raphanus

Une dose de 8,5 μ de ^{45}Ca est mise à la disposition de 25 plantes pendant 24 heures.

II-1. *Pénétration du Ca^{++} dans la plante.*

La figure I montre l'évolution de la radioactivité d'une plantule au stade 4 feuilles après 24 heures de séjour dans la solution marquée. La courbe se divise en 2 *segments de pente différente*, le 2^{e} segment est une droite que l'on peut extrapoler à 0 heure. La courbe s'explique logiquement (comme l'on fait Epstein et Leggett, 1954) par l'existence de 2 compartiments :

— l'un -a- est rapidement en équilibre isotopique avec la solution extérieure ;

— l'autre -b- dans lequel le Ca marqué pénètre continuellement.

Connaissant l'activité spécifique de la solution marquée, on peut déduire la capacité du compartiment -a- et la vitesse de pénétration du

Ca dans le compartiment -b- : dans le cas de la fig. 1, le compartiment -a- contient 8.% du Ca total de la plante et en 24 heures, la quantité qui a pénétré dans le compartiment -b- correspond à 28 % du Ca total de la plante.

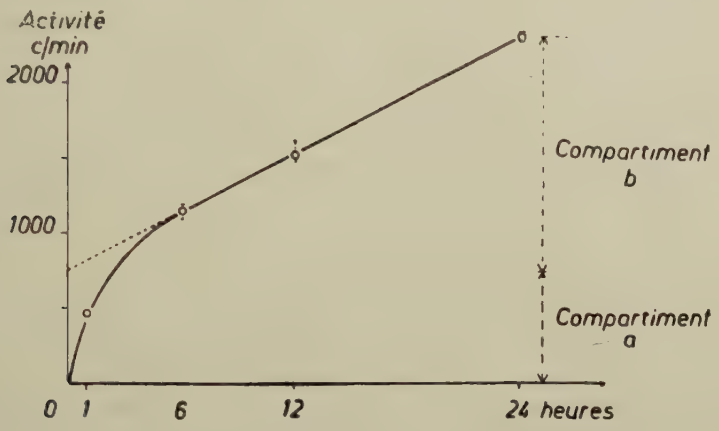


Fig. 1 — Pénétration du Ca marqué dans une plantule à 4 feuilles, au cours d'un traitement de 24 heures des racines

Caractéristiques du compartiment -a-

1. En détaillant l'évolution de l'activité pendant les premières minutes de traitement, on voit que le compartiment -a- est en équilibre avec la solution radioactive après 1 heure de contact (fig. 2) ; le demi-équilibre est déjà réalisé après 10 minutes.

2. Après 1 heure de traitement, les racines sont plongées dans la solution nutritive stable pendant 10, 30 et 60 minutes (fig. 2). On enregistre une perte d'activité très forte pendant les premières minutes : après une heure la quantité de Ca marqué qui est libérée dans le milieu correspond à la capacité du compartiment -a-. La fig. 2. est formée de 2 courbes inverses : elles expriment un même phénomène : la réalisation de l'équilibre entre les ions Ca^{++} normaux et les ions Ca^{++} marqués dans le compartiment -a-.

3. Si les plantes traitées sont plongées dans l'eau distillée, elles libèrent également du Ca marqué. Après une heure, cette quantité correspond à *la moitié* de la perte enregistrée dans la solution nutritive normale.

4. Le graphique (fig. 3) prouve que les quantités de Ca marqué libérées par les racines soit dans l'eau distillée, soit dans la solution normale sont indépendantes de la durée du traitement, c'est-à-dire de la teneur en Ca marqué du compartiment -b-. Ainsi le compartiment

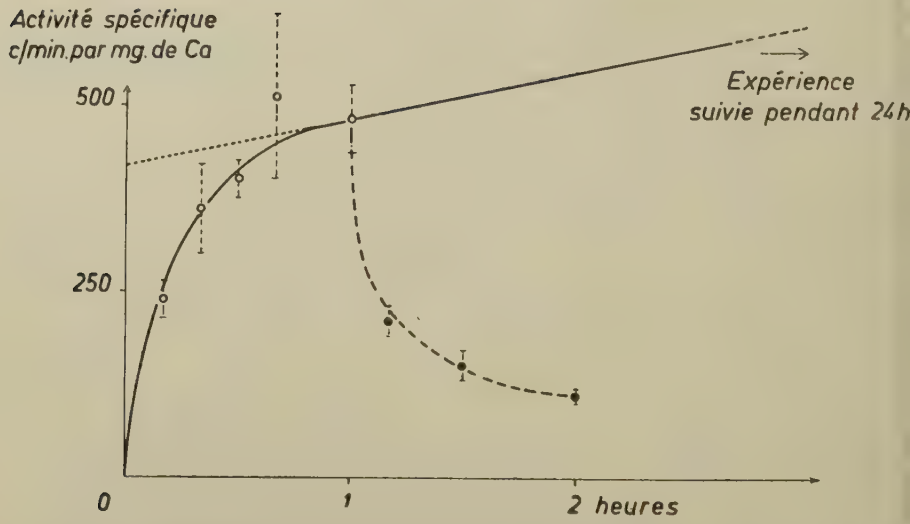


FIG. 2 — Absorption du Ca marqué dans une solution radioactive et libération de Ca marqué dans une solution normale de même composition (plante au stade de prétubérisation)
°———° racines plongées dans la solution radioactive
°- - - - -° racines plongées dans la solution normale
°.....° extrapolation déterminant la capacité du compartiment -a-

-a- se divise en 2 autres d'importance égale dans notre expérience : l'un s'équilibre avec l'eau distillée, l'autre uniquement avec la solution de même concentration ionique.

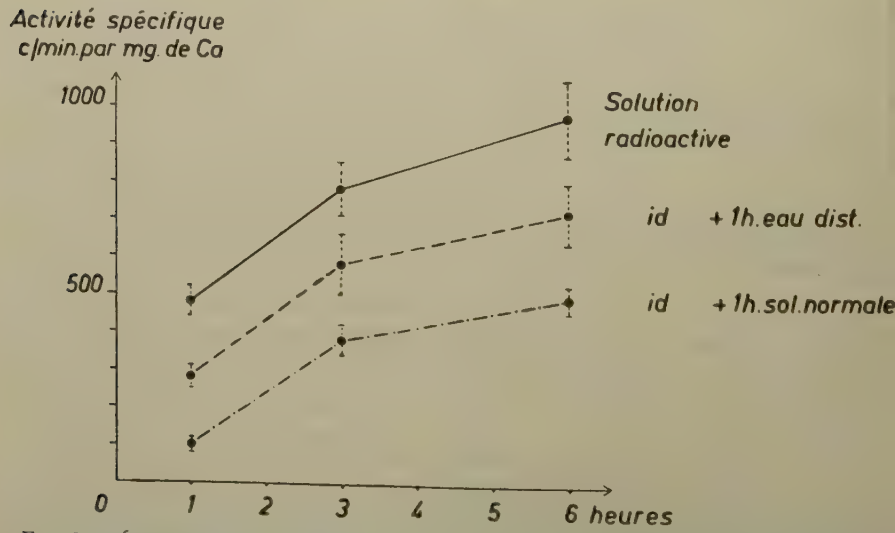


FIG. 3 — Évolution de la quantité de Ca marqué libérée dans l'eau distillée et dans la solution normale en fonction de la durée du traitement (plantes au stade de prétubérisation)

Caractéristiques du compartiment -b-

1. Le Ca marqué pénètre continuellement dans le compartiment -b- et la quantité absorbée n'est pas influencée par un retour de la solution radioactive à la solution normale ou à l'eau distillée.

2. Pour savoir si les ions, qui ont pénétré dans le compartiment -a-, passent dans -b-, on a réalisé l'expérience suivante : des plantes marquées pendant une heure sont divisées en 2 lots ; l'un replacé en solution saline non radioactive, l'autre placé d'abord en eau distillée pendant des durées diverses (trois) et ensuite pendant une heure en solution non radioactive (fig. 4).

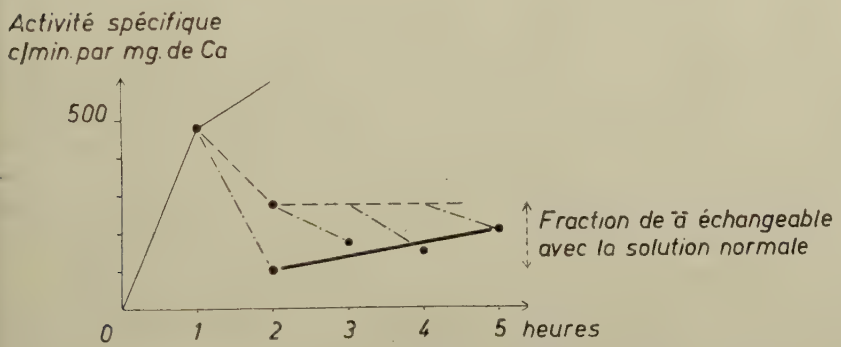


Fig. 4 — Augmentation avec le temps de séjour dans l'eau distillée de la quantité de Ca marqué non échangeable avec la solution normale (plantes au stade de prétubérisation)
o——o racines plongées dans la solution radioactive
o- - - -o racines plongées dans l'eau distillée
o- .—. —. racines plongées dans la solution normale

Dans ces conditions, les ions Ca^{++}, qui ne sont pas libérés dans l'eau distillée, constituent *la seule source de Ca de la plante.* On voit que l'activité spécifique est d'autant plus grande que le séjour en eau distillée a été prolongé. Le passage des ions Ca^{++} du compartiment -a- au compartiment -b- est donc fonction de la durée du contact avec l'eau distillée ; il est quantitativement *important*, car au cours des 3 heures que durent l'expérience, il concerne la moitié du Ca qui pénètre en -b-.

***

Il semble donc que le compartiment -a- contienne les ions qui pénètrent passivement dans la plante et que, dans le compartiment -b-, on ne trouve que les ions Ca^{++} qui ont pénétré dans les cellules par processus actif.

Deux processus dirigent la pénétration passive :

a) la diffusion : l'équilibre se fait rapidement avec le milieu que ce soit la solution saline ou l'eau distillée ;

b) l'échange d'ions : les ions Ca^{++} marqués s'équilibrent avec les cations fixés sur les anions organiques cellulaires. Ce Ca n'est pas libéré si le milieu extérieur est de l'eau distillée.

Influence du stade de développement de la plante sur la pénétration des ions Ca^{++}.

1. Proportionnellement à la quantité totale de Ca de la plante la pénétration passive est d'autant plus grande que la plante est plus jeune ; elle représente 8 % du Ca total d'une plantule à 4 feuilles et 4 % chez une plante au stade de prétubérisation.

2. Une plantule à 4 feuilles absorbe métaboliquement en 24 h. du Ca marqué qui correspond aux 28 % de son Ca total. Au stade de prétubérisation, cette valeur est de 15 % ; lors de la tubérisation, de 6 %.

II-2. *Localisation du Ca^{++} dans la plante*

1. Les feuilles accumulent le Ca pendant toute leur vie. Cette accumulation est rapide lorsque la feuille est jeune, puis devient de moins en moins importante.

2. Le compartiment -a-, dont on a parlé ci-dessus pour la plante entière, se localise entièrement dans les racines.

3. Le Ca^{++} ne s'accumule pas dans le tubercule.

II-3. *Redistribution du Ca.*

On met en solution radioactive pendant 24 heures des plantules au stade 2 feuilles que l'on transporte ensuite en solution normale ; l'activité des différents organes a été mesurée 1 jour, 8 jours et 15 jours après (fig. 5) (respectivement A, B, C).

La radioactivité totale d'une plante est la même dans les 3 séries. Il n'y a donc pas de perte de Ca dans les plantes.

La localisation première figurée par la série A est conforme aux résultats précédents. Pendant le temps qui sépare A et B il se passe deux phénomènes :

a) les organes de transport se vident de leur Ca : diminution correspondant à 8,5 % de la radioactivité totale ;

b) les cotylédons, feuilles 1 et 2 perdent une quantité de Ca qui représente 9,3 % de la radioactivité totale.

Ces 2 transports se font au profit des feuilles plus jeunes. On observe donc une redistribution faible, affectant 9,3 % du Ca absorbé en 24

heures, en faveur des feuilles qui se développent. Le transport de Ca est encore beaucoup plus faible pendant les 7 jours suivants : il existe un départ de Ca des feuilles 4 et des feuilles nouvelles (3,4 % de la radioactivité totale) vers les feuilles 2 et 3.

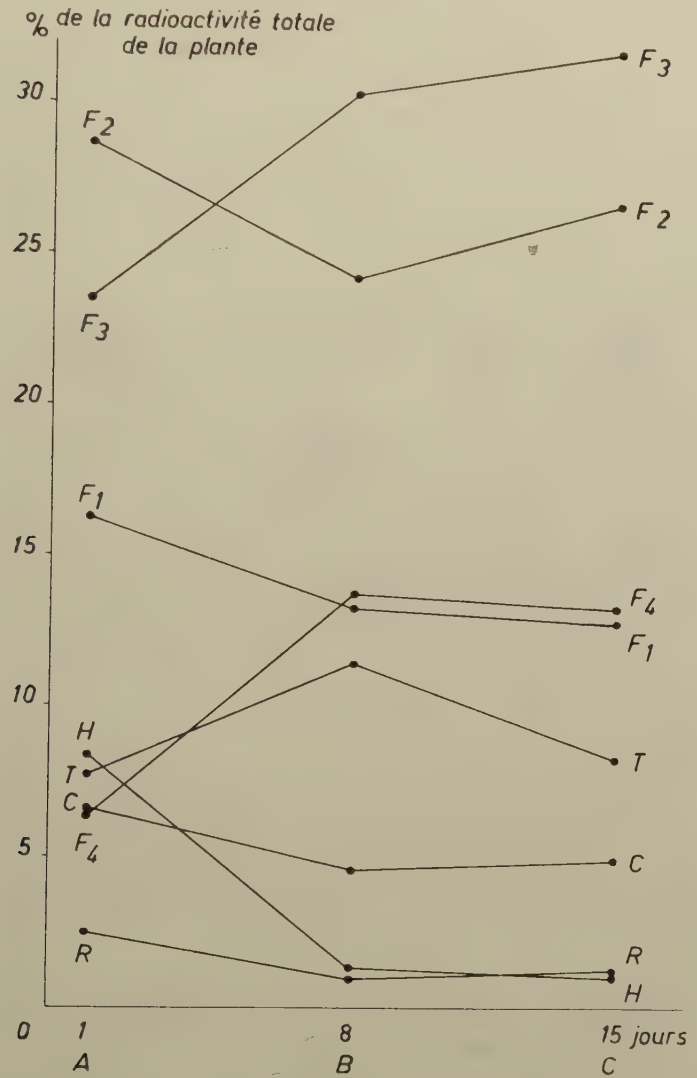


Fig. 5. — Évolution de la répartition du Ca marqué pendant les 15 jours qui suivent un traitement des racines de 24 h. (plantes portant 2 feuilles au moment du traitement).
En abscisse : les jours qui suivent le traitement.
En ordonnée : activité des différents organes en % de l'activité totale de la plante (R : racines ; H : hypocotyle ; T : tige et bourgeon ; C : cotylédons ; F : feuilles numérotées suivant leur ordre d'apparition ; F_4 : représente dans les séries B et C la feuille 4 et les feuilles qui ont apparu depuis la fin du traitement).

Les plantes de la fig. 6 se trouvent dans les conditions A et B de l'expérience : on voit très bien la faible activité des feuilles développées après la fin du traitement. Le ^{45}Ca se concentre particulièrement dans les poils épidermiques, on sait que la précipitation du CaCO est une caractéristique des ces formations chez les Crucifères, comme le radis.

Donc dans le Ca marqué, absorbé en 24 heures et fixé dans les feuilles pendant les 24 heures qui suivent, il existe une fraction mobilisable peu importante, représentant environ 9 % de la quantité absorbée en 24 heures. Elle se distribue à partir des feuilles jeunes vers les feuilles qui apparaissent ensuite ou vers les feuilles âgées, si la croissance est ralentie.

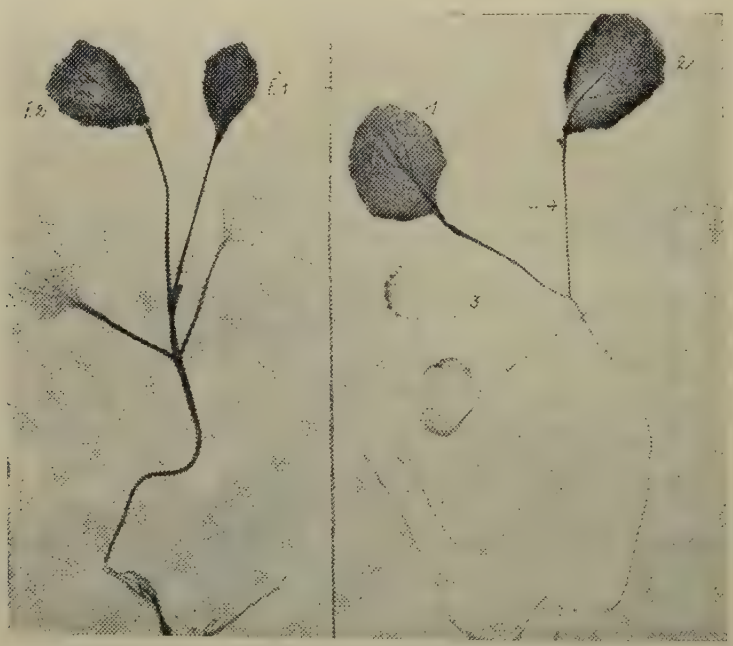


FIG. 6 — Évolution en 8 jours de la répartition du Ca marqué.
Plantules à 2 feuilles dont les racines sont traitées pendant 24 heures.
En A : 1 jour après le traitement.
En B : 8 jours après le traitement (2 nouvelles feuilles, 3 et 4, se sont développées)

III. LES VARIATIONS JOURNALIÈRES DE L'ABSORPTION DES IONS PO_4^{---} ET Ca^{++}.

Les figures 7 à 9 expriment parfaitement bien les fluctuations qu subit l'absorption des ions PO_4^{---} et Ca^{++} durant un cycle de 24 heure

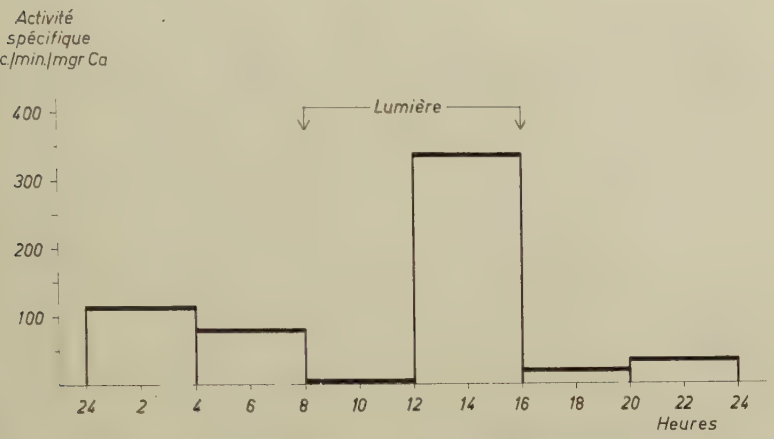


Fig. 7 — Variation journalière de l'activité spécifique du Ca chez des Radis au stade plantule à 4 feuilles

Les valeurs les plus hautes sont atteintes durant le jour tandis que des valeurs plus faibles se constatent la nuit.

Ce rythme journalier est général : nous l'avons trouvé chez *Sinapis* comme chez *Raphanus* à divers stades du développement et pour les 2 ions considérés. Seule l'absorption active est intéressée par ces variations ; la pénétration passive du Ca^{++} s'est montrée similaire la nuit et le jour (tableau 2).

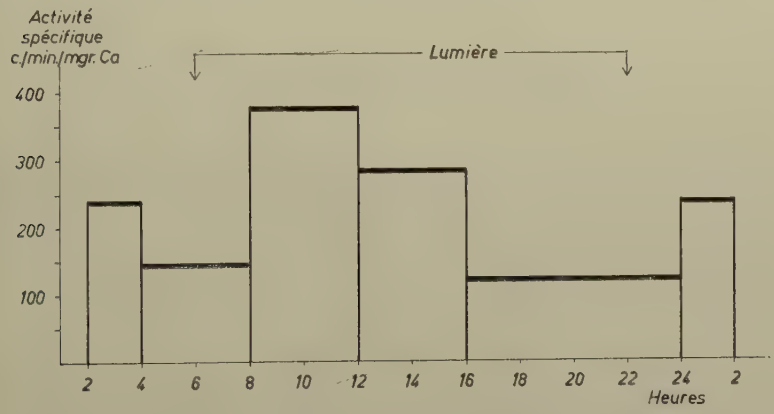


Fig. 8 — Variation journalière de l'activité spécifique du Ca chez des *Sinapis* au stade de préfloraison (apparition des boutons floraux)

TABLEAU II

Activités spécifiques des plantes après un traitement de 2 heures en coups/minute/mgr de Ca

	NUIT	JOUR
Sinapis (préfloraison)	440	407
Raphanus (plantule)	153	178

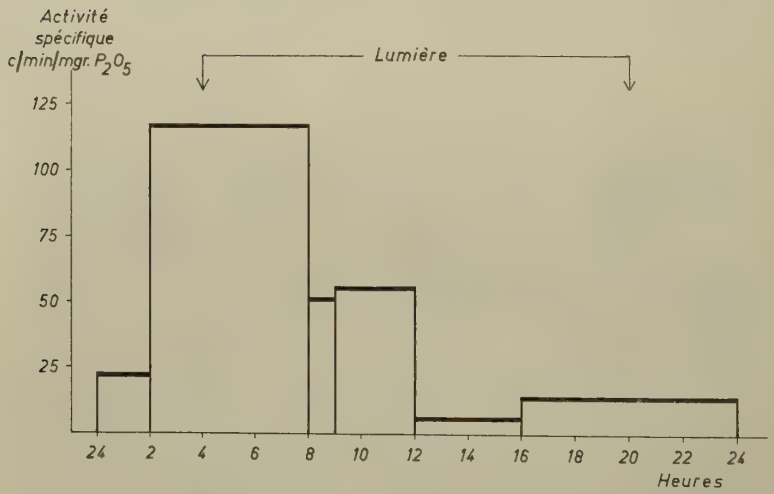


FIG. 9 — Variation journalière de l'activité spécifique du PO_4 dans la feuille n° 3 de *Sinapis* au stade plantule à 4 feuilles

Discussion et conclusions

1. Le stade de développement détermine l'intensité de l'absorption des ions PO_4^{--} et Ca^{++}. La quantité d'ion marqué pénétrant dans un végétal, par rapport à la quantité du même ion non marqué, est une mesure de *l'âge physiologique de la plante.*

A un stade donné du développement, les feuilles les plus jeunes accumulent davantage que les feuilles âgées. C'est la même constatation que celle de BIDDULPH (1940), RABIDEAU et coll. (1950) et RIRIE et TOTH (1952).

A chaque stade, la quantité d'ion marqué accumulée dans une feuille, par rapport à la quantité du même ion non marqué, caractérise l'*âge physiologique propre de cette feuille.*

2. L'absorption du Ca^{++} se réalise en deux phases :

— une partie des ions Ca^{++} qui ont pénétré dans les racines reste mobile et peut en sortir pour s'équilibrer avec les ions de la solution nutritive. Si la solution normale est remplacée par de l'eau distillée, l'équilibre se réalise en mobilisant une quantité d'ions Ca^{++} des racines deux fois moindre. Ces équilibres se réalisent en 1 heure, ils représentent la composante passive de la pénétration du Ca^{++} dans les racines.

— la majeure partie des ions Ca^{++} qui ont pénétré dans les racines ne peut se libérer dans le milieu extérieur ; elle constitue la partie qui a pénétré activement et qui est liée métaboliquement au contenu cellulaire.

Nos résultats s'accordent donc avec ceux de Epstein et Leggett (1954).

Nous montrons encore que le rapport pénétration passive/accumulation active diminue avec le développement du radis (jusqu'à la tubérisation). Ceci indique vraisemblablement que le développement de la surface radiculaire n'est pas proportionnel à celui de la partie aérienne.

On s'est demandé si l'absorption active dépendait de la pénétration passive ; en d'autres mots, si les phénomènes d'adsorption constituaient la première étape dans le processus de l'accumulation. Laties (1959) semble être partisan de l'indépendance des 2 phénomènes.

Nous avons cependant montré que, lorsque les ions Ca^{++} adsorbés étaient la seule source de Calcium de la plante, l'absorption active se réalisait aux dépens de ces ions adsorbés.

3. L'ion Ca^{++} fixé dans les feuilles est peu redistribué : environ 9 % du ^{45}Ca absorbé en 24 heures se redistribuent en 7 jours, 3 % seulement au cours des 7 jours qui suivent.

Biddulph (1954) défend l'idée de l'immobilité complète du Ca des feuilles. Remarquons cependant que les études de redistribution faites *uniquement* au moyen d'autoradiographies ne peuvent révéler les variations minimes que nous avons observées avec nos techniques d'analyse.

Nos résultats s'accordent mieux avec ceux de Corin, Lecrenier *et coll.* (1957), de Bukovac et Wittwer (1957) et de Lausch (1958).

4. Le renouvellement des ions PO_4^{--} et Ca^{++} suit un rythme journalier : il atteint toujours son intensité maximale durant le jour. Ces variations journalières se retrouvent dans la plante entière et dans chacun de ses organes pris séparément ainsi qu'à tous les stades du développement considérés.

Hanson et Biddulph (1953) avaient déjà montré, chez le Haricot, que l'absorption et la translocation du phosphore suivaient un rythme journalier.

5. L'ion Ca^{++} ne s'accumule pas sélectivement dans le tubercule du radis. Ce résultat présente un certain intérêt car on peut considérer que le ^{90}Sr, élément principalement disséminé lors des explosions atomiques, se localise comme le Ca. En effet, ces deux ions sont très voisins d'un point de vue physiologique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Biddulph, O. Absorption and Movement of Radiophosphorus in Bean Seedlings. *Plant Physiol.*, 15, 131-136 (1940).
2. Biddulph, O. The distribution of P, Ca, S, Fe in the bean plants as revealed by use of radioactive isotopes : Analyse des plantes et problèmes des engrais minéraux. Paris, I.R.H.O., 1-10 (1954.)
3. Bukovac, J. M. et Wittwer, S. H. Absorption and mobility of foliar applied nutrients, *Plant. Physiol.*, 32, 428-435 (1957).
4. Corin, Lecrenier et Coll. Contribution à l'étude de la nutrition minérale des arbres fruitiers au moyen d'isotopes radioactifs. Unesco/ns/ric/180 (1957).
5. El Hinnawy, E. I. Some aspects of mineral nutrition and flowering. *Mededelingen van de Landbouwhogeschool te Wageningen/Nederland*, 56(9), 1-51, (1956).
5. Epstein, E. et Leggett, J. E. The absorption of alkaline earth cations by barley roots. Kinetics and mechanism. *Amer. Journ. Bot.*, 41, 10, 785-791 (1954).
7. Epstein, E. Mineral nutrition of plants : mecanisms of uptake and transport. *Ann. Rev. of Pl. Physiol.*, 7, 1-25 (1956).
8. Gauch, H. G. Mineral nutrition of plants. *Ann. Rev. of Pl. Physiol.*, 8, 31-64 (1957).
9. Hanson, J. B. et Biddulph, O. The diurnal variation in the translocation of minerals across bean roots, *Plant Physiol.*, 28, 356-370 (1953).
10. Laties, G. G. Active transport of salt into plant tissue. *Ann. Rev. of pl. Physiol.*, 10, 87-112 (1959).
11. Lausch, E. Untersuchungen über Calcium Rüchtransport in höheren Pflanzen. *Flora*, 145, 542-587 (1958).
12. Rabideau, G. S., Whaley, W. G., et Heimsch, C. The absorption and distribution of radioactive phosphorus in two Maize inbreds and their hybrid. *Amer. Journ. Bot.*, 37, 93-100 (1950).
13. Ririe, D. et Toth, S. Plant studies with radioactive Ca. *Soil. Sci.*, 73, 1-10 (1952).
14. Robertson, R. N. The uptake of minerals. *Encyclop. Pl. Physiol.*, Berlin, 4, 243-279 (1958).
15. Went F. W. The experimental control of plant growth. Chronica Botanica Co. (1957).

Résumé

L'étude de l'absorption des ions Ca^{++} et PO_4^{---}, à l'aide du Ca^{45} et du P^{32}, réalisée sur *Raphanus sativus* L. et *Sinapis alba* L. cultivés en aquiculture et dans le milieu strictement conditionné du phytotron de Liége a permis d'arriver aux conclusions suivantes :

1. Le stade de développement du végétal détermine l'intensité de l'absorption des 2 ions. Réciproquement, la quantité d'ion marqué absorbé par rapport à la quantité du même ion non marqué est une mesure de l'âge physiologique de la plante.

2. A tous les stades du développement, le renouvellement des ions Ca^{++} et PO_4^{---} suit un rythme journalier atteignant son intensité maximale le jour.

3. L'absorption du Ca^{++} se réalise en 2 phases : une phase passive et une phase active liée au métabolisme. La phase passive se réalise par 2 processus d'importance égale : par simple diffusion et par équilibre de Donnan. Lorsque les ions Ca^{++} adsorbés sont l'unique source en Ca de la plante, l'absorption active se réalise à leurs dépens.

4. L'ion Ca^{++} fixé dans les feuilles de *Raphanus* se redistribue pendant une semaine à raison de 9 % de la quantité absorbée en 24 heures.

Penetration and localization of Ca^{++} and Po_4^{---} ions in *Raphanus sativus* L. and *Sinapis alba* L.

Summary

The following conclusions are inferred from the study of absorption of Ca^{++} and PO_4^{---} in *Raphanus sativus* L. and *Sinapis alba* L. grown on water under the strictly controlled conditions of the Liège phytotron :

1. The stage of development of the plant determines the intenseness of absorption of the 2 ions. Reciprocally, the quantity of marked ion absorbed, with reference to the quantity of the same non-marked ion, measures the physiological age of the plant.

2. At all stages of the development, the renewing of the Ca^{++} and PO_4^{---} ions follows a daily turn reaching its highest intenseness in daylight.

3. The absorption of Ca^{++} takes place in 2 phases : a passive phase, and an active phase in connection with metabolism. The passive phase takes place under 2 processes of equal importance : by simple diffusion and by Donnan equilibrium. When the absorbed Ca^{++} ions are the only source of Ca for the plant, active absorption takes place at their expense.

4. The Ca^{++} ion fixed in the leaves of Raphanus is redistributed during one week at the rate of 9 per cent of the quantity absorbed in 24 hours.

Das Eindringen und das Festsetzen von Ca^{++} und PO_4^{---} Ionen bei *Raphanus sativus* L. und *Sinapis alba* L.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Studium der Aufnahme von Ca^{++} und PO_4^{---} Ionen an Hand von Ca^{45} und P^{32} bei *Raphanus sativus* L. et *Sinapis alba* L., die in Aquakultur und unter strikten Bedingungen des Phytotrons in Lüttich angebaut wurden, hat es ermöglicht, folgende Schlussfolgerungen zu ziehen :

1. Das Entwicklungsstadium der Pflanze bestimmt die Aufnahmeintensität der beiden Ionen. Und umgekehrt ist die Mengenaufnahme des gezeichneten Ions im Vergleich zur Menge des gleichen nicht gezeichneten Ions ein Masstab des physiologischen Alters der Pflanze.

2. In allen Entwicklungsstadien verfolgt die Erneuerung der Ca^{++} und PO_4^{---} Ionen einen täglichen Rythmus, der seine maximale Intensität während des Tagesverlaufs erreicht.

3. Die Ca^{++} Aufnahme geschieht in zwei Phasen : eine passive und eine aktive Phase, die an den Metabolismus gebunden sind. Die passive Phase geht in zwei Verfahren von gleicher Wichtigkeit vor sich : durch einfache Diffusion und durch das Gleichgewicht von Donnan.

Falls die adsobierten Ca^{++} Ionen die einzige Ca Quelle der Pflanze sind, so geschieht die aktive Aufnahme auf Kosten dieser Ionen.

4. Das Ca^{++} Ion, das in den Blättern von Raphanus fixiert ist, verteilt sich wieder während einer Woche zu 9 % der in 24 Stunden aufgenommenen Menge.

Bull. Soc. Royale Sciences Liège, 30e année, nº 5-6, 1961, pp. 258-275

ÉVALUATION DES TENEURS EN CHLOROPHYLLES ET VITAMINES DES GRAINS D'ORGE SECS OU GERMÉS, PENDANT 6 JOURS, SUR SOLUTION MINÉRALE NUTRITIVE ET SOUS LUMIÈRE ARTIFICIELLE DES TUBES PHYTOR C. R. H. Lg.

par M. BOUILLENNE-WALRAND,
Sous-Directeur du Centre de Recherches des Hormones Végétales (I.R.S.I.A.)
et R. BOUILLENNE,
Professeur à l'Université de Liège

Introduction

Le pouvoir nutritionnel des aliments d'origine végétale (ou animale) a été jusque dans ces dernières années exprimé uniquement par la valeur énergétique des composés organiques qui les constituent principalement : sucres, graisses, protéines. Cette valeur énergétique est calculée en établissant le bilan calorigénique (à la bombe calorique).

En ce qui concerne la valeur fourragère des céréales notamment on a eu l'habitude de prendre comme base de calculs la quantité totale d'hydrates de carbone (glucides) utilisable, évaluée, de la même manière, en calories.

Ces expressions de la valeur nutritionnelle ou fourragère d'aliments fournis aux animaux sont aujourd'hui périmées car elles n'ont guère de sens biologique ; elles amèneraient la conclusion que des céréales et en général des herbages verts, qui ont perdu une partie de leur réserve glucidique au cours de la germination, donneraient un rendement alimentaire considérablement diminué par rapport au grain sec et non germé. Or le comportement des animaux, dont la croissance et la santé sont nettement améliorées

Manuscrit reçu le 16 février 1961.

par la consommation de fourrage vert, en apporte le démenti expérimental.

C'est qu'en effet, à côté des aliments trophiques (sucres, graisses, protéines, sels minéraux) absorbés en quantités considérables existe tout le bagage des micro-aliments, vitamines, hormones, enzymes et co-enzymes qui sont nécessaires au développement harmonieux de l'individu.

Le terme aliment est pris ici dans son sens le plus large : toute substance contribuant à assurer la croissance, le développement, le fonctionnement de l'organisme qui les absorbe ; il englobe donc les macro et les micro-aliments.

Pour les vitamines, on sait depuis longtemps que l'organisme animal est incapable d'élaborer lui-même la majeure partie de celles dont il a besoin, par exemple, le Carotène (Pro-Vitamine A.), l'Acide ascorbique (Vitamine C), les Tocophérols (Vitamine E), l'Acide pantothénique (Biotine), la Riboflavine (Vitamine B2), la Pyridoxine (Vitamine B6), la Phylloquinone (Vitamine K). Elles doivent être absorbées avec la nourriture.

Toutes ces vitamines sont indispensables au fonctionnement cellulaire pour des raisons non encore totalement élucidées. Certaines servent de protecteurs contre les infections. Elles agissent en doses infinitésimales. Leur carence entraîne des lésions organiques graves. Elles constituent donc des facteurs nutritionnels indispensables à la croissance, au développement, au maintien de la santé des organismes vivants. D'une manière générale, ce sont les plantes et certains micro-organismes qui en réalisent la synthèse.

Il importe donc d'attirer l'attention sur la valeur des vitamines dans le déroulement des phénomènes de nutrition, car souvent des maladies de carence alimentaire sont provoquées par des déficiences vitaminiques et non par des insuffisances en calories.

L'importance des végétaux verts dans la production de ces catalyseurs de croissance est souvent négligée ; il en résulte que l'évaluation de leur valeur nutritionnelle est sujette à caution.

Il faut également souligner le rôle de la lumière dans l'absorption et la destinée biochimique des éléments puisés par les racines dans le milieu nutritif.

En l'absence d'une lumière adéquate les racines absorbent les sels mais ne les utilisent pas complètement (Chouard, 4, p. 169).

Les solutions minérales nutritives dans lesquelles baignent les racines des plantules doivent être de composition équilibrée.

Qu'elles soient dans le sol ou qu'elles soient en aquiculture et pour autant qu'elles soient aérées, elles favorisent croissance et rendement. Au point de vue de l'alimentation animale, les jeunes herbages, ayant poussé sur une solution nutritive complète, apportent sous forme assimilable et en quantité suffisante les éléments nécessaires à la constitution du squelette et indispensables au fonctionnement du métabolisme d'un animal sain. Ils contribuent à donner aux rations leur haute valeur qualitative.

Parmi les substances minérales solubles, les unes sont utilisées en quantités assez importantes (éléments macro-trophiques) et les autres en quantités infinitésimales (éléments micro-trophiques ou oligo-éléments).

Les éléments macro-trophiques comportent l'Azote, le Phosphore, le Potassium, éléments dits capitaux, ainsi que le Soufre, le Calcium, le Magnésium. Ils participent à la constitution du protoplasme vivant, des membranes et des réserves nutritives.

Les oligo-éléments interviennent comme catalyseurs. On peut citer le Fer, le Bore, le Zinc, l'Iode, le Manganèse, le Cuivre, le Molybdène, le Cobalt, le Vanadium.

La mise en œuvre par les végétaux des éléments macro-trophiques minéraux obéit :

1) *A la loi du minimum* : L'absence totale ou la carence de l'un des éléments, même si les autres sont en quantités optimales, limite la croissance, c'est-à-dire que si l'un des éléments n'a pas pris sa place en proportion appropriée dans la chaîne des processus biochimiques, ceux-ci sont ralentis ou arrêtés (c'est la loi que l'on appelle aussi : loi des facteurs limitants).

2) *A la loi des équilibres* : Non seulement les divers éléments minéraux doivent être présents, mais aussi ils doivent co-exister dans des proportions convenables. Si l'un d'eux est en quantité trop considérable, il empêche l'absorption d'un ou de plusieurs autres éléments nécessaires ; il peut devenir toxique. Entre l'Azote, le Phosphore, le Potassium on a pu préciser la nécessité de rapports quantitatifs balancés. Le rapport N. P. K. est à la base de toutes les fumures minérales bien étudiées. Une solution nutritive ioniquement balancée doit être conçue de manière que les ions positifs et négatifs non absorbés s'équilibrent et qu'ainsi le pH de la solution ne soit pas considérablement altéré par une absorption sélective d'un ou plusieurs ions.

Voici à titre d'exemple un tableau tiré de WALLACE [12] montrant chez certaines espèces la variation des teneurs des principaux éléments minéraux entre plantes saines et plantes de croissance insuffisante. Le contenu minéral de ces plantes est une image claire du fait que, dans le premier cas, elles ont bénéficié d'un milieu correspondant à leurs besoins et que, dans le second, elles ont été carencées, et ceci peut se produire *même si tous* les éléments essentiels se trouvent dans le milieu.

TABLEAU I

Composition minérale en % de matière sèche.

Plantes ou parties de plantes	État de santé	CaO	MgO	K_2O	P_2O_5
Froment-sommet des plantules	saines	1.93	0.50	4.93	0.81
	déficientes	0.20	0.13	0.71	0.10
Avoine-sommet des plantules	saines	1.60	0.56	5	0.78
	déficientes	0.58	0.15	0.80	0.20
Lin-sommet des plantules	saines	0.80	0.20	1.45	0.20
	déficientes	0.40	0.08	0.70	0.12
Choux de Bruxelles	saines	6.60	0.97	4.50	0.60
	déficientes	0.62	0.23	0.92	0.21
Betteraves à sucre	saines	3.7	0.91	5.07	0.80
	déficientes	0.92	0.16	0.97	0.28
Tomates	saines	7.97	0.80	6.0	0.90
	déficientes	0.81	0.22	1.2	—
Pommes	saines	1.56	0.4	1.97	0.42
	déficientes	0.78	0.25	0.72	0.23

D'une manière générale la formation de la matière organique est favorisée par un sol de la *meilleure fertilité* (W. S. SLJIN, 10, 1958) étant entendu que ce terme comprend la composition qualitative, quantitative et relative des différents éléments minéraux nécessaires.

Le détermination des besoins minéraux d'une plante dans un sol donné est réalisée actuellement par la technique du diagnostic foliaire, proposée naguère par LAGATU [11] et mise au point depuis avec beaucoup d'efficacité. Elle permet, en analysant le contenu minéral de feuilles homologues, parallèlement dans une plante à son optimum physiologique et dans une plante déficiente, de connaître

ce qui manque à celle-ci en éléments minéraux dans le sol. Aujourd'hui on réussit à cultiver sur des milieux artificiels dont la composition peut être établie avec précision et qui ne contiennent aucune matière inutile, voire nocive. Ils peuvent être adaptés non seulement aux différentes espèces mais, en outre, à l'âge physiologique des individus. Pour la germination et la croissance des plantules, ils ne sont pas identiques à ceux qui valent pour les plantes adultes en fleurs ou en fruits. Dans ce dernier cas, la concentration de 3 à 5 gr. de sels par litre est adéquate tandis que pour les plantules en voie de germination, on ne dépasse pas 0,5 à 1,5 gr. par litre.

En somme, les plantes élevées en aquiculture sont physiologiquement et chimiquement plus propres à la consommation que les plantes cultivées en terre ordinaire. Cette conclusion a son importance pour la sécurité qu'elle apporte en matière de cancérologie. Elle est valable évidemment à condition que les plantes soient placées sous bonne lumière et que la composition des solutions soit appropriée.

Le problème de l'éclairage artificiel des plantes a reçu depuis peu des solutions très satisfaisantes. Une des solutions a été découverte pour la première fois en Belgique grâce à l'utilisation d'un Phytotron (Liège), c'est-à-dire d'un appareil à faire des climats divers, dans des enceintes, serres et chambres noires, où les végétaux peuvent être introduits. Un climat déterminé peut y être établi et maintenu constant automatiquement, quelles que soient les variations du milieu extérieur. Dans de telles conditions constantes et reproductibles, la croissance des plantes a pu être étudiée comparativement sous la lumière du jour naturel et sous une gamme de lumières artificielles.

Dans le Phytotron de Liège, un groupe de chercheurs a réussi à créer de toutes pièces un nouveau type de lumière fluorescente dont les longueurs d'onde émises correspondent à peu près aux longueurs d'onde absorbées par les plantes à partir de la lumière solaire. Le tube Phytor C.R.H.Lg. ainsi constitué ne donne pas de lumière ultra-violette ni d'infra-rouge ; son spectre d'émission (en intensité relative équivalente) suit d'assez près le spectre d'absorption de la chlorophylle (Bouillenne et all. : 1953, 1954, 1955, 1958).

Ce tube horticole est fabriqué en Belgique en grande série et se vend également à l'étranger. Il a récemment servi dans un Congrès en Angleterre comme élément de comparaison avec d'autres

sources de lumière artificielle. Il ne présente aucun danger pour l'homme ni pour les végétaux.

L'utilisation de lumière artificielle sous la forme de tubes fluorescents produisant les seules longueurs d'onde nécessaires aux végétaux verts, est une innovation très importante dans l'aménagement de serre ou de tout autre local dans lequel on veut entretenir des plantes.

C'est ainsi qu'aujourd'hui non seulement on peut cultiver les plantes : *sans sol*, grâce aux solutions nutritives appropriées aux différentes espèces mais aussi *sans soleil*, grâce à des tubes de lumière froide qui livrent les rayons lumineux utiles aux synthèses chlorophylliennes.

Recherches expérimentales

Nous avons suivi l'évolution d'une variété d'Orge (Kénia) placée dans un germoir perfectionné pendant les 6 à 7 premiers jours de la germination. Nous avons examiné biométriquement et biochimiquement le déroulement des premières étapes jusqu'à la constitution de plantules, d'une hauteur moyenne de 18 à 20 cm. Ces observations et analyses ont été répétées pendant les trois premiers mois de 1960.

Le germoir utilisé se présente sous l'aspect d'une grande armoire cloisonnée de plastic et comportant 6 étages en forme de bacs. Sur chaque étage sont disposés des paniers en tôle d'aluminium perforée où sont répandus les grains. Ceux-ci ont été préalablement trempés pendant 24 heures puis prégermés 48 heures dans des bacs spéciaux placés à la partie inférieure de l'armoire. Les solutions minérales nutritives sont placées dans un bac au sommet de l'armoire et distribuées automatiquement d'étage en étage par un mécanisme de siphonnage intermittent. L'appareil a été réglé pour trois arrosages par jour.

La solution minérale nutritive inspirée des travaux de M. Homès [9] et calculée pour les besoins des plantules séjourne dans chaque étage environ ½ heure et atteint les grains ou les plantules à travers la tôle perforée des paniers. La composition de la solution nutritive a été spécialement étudiée en laboratoire et est déposée dans le bac d'alimentation à raison de 100 grammes par jour et pour 130 litres d'eau.

Le germoir est équipé de lampes Phytor C.R.H.Lg. et constitue

un milieu écologique complet. Il a été jusqu'à présent aménagé pour la germination de grains de céréales (orge, avoine, froment, maïs, etc...). Mais il est apte à recevoir d'autres espèces végétales non seulement jusqu'au stade de plantules vertes, ce qui le rend extrêmement intéressant comme pépinière, à l'abri des dangereuses fluctuations climatiques et des parasites (notamment en région tropicale), mais aussi jusqu'à la production des plantes herbacées adultes (légumes ou plantes à fleurs).

Les germoirs peuvent être placés dans n'importe quel local à condition que celui-ci soit aéré et maintenu à une température modérée. Dans nos expériences, le germoir a été monté dans une grande chambre dont la température oscille entre 20 et 25° et qui n'est éclairée que par une lumière naturelle très faible.

Les figures I et II représentent l'évolution des températures aux différents étages du germoir et l'état des plantules d'orge aux différents jours de la germination.

La figure III montre la différence de couleur existant entre les plantules du centre d'un bac éclairé perpendiculairement par un tube Phytor et celles des côtés du même bac qui reçoivent latéralement la lumière du tube.

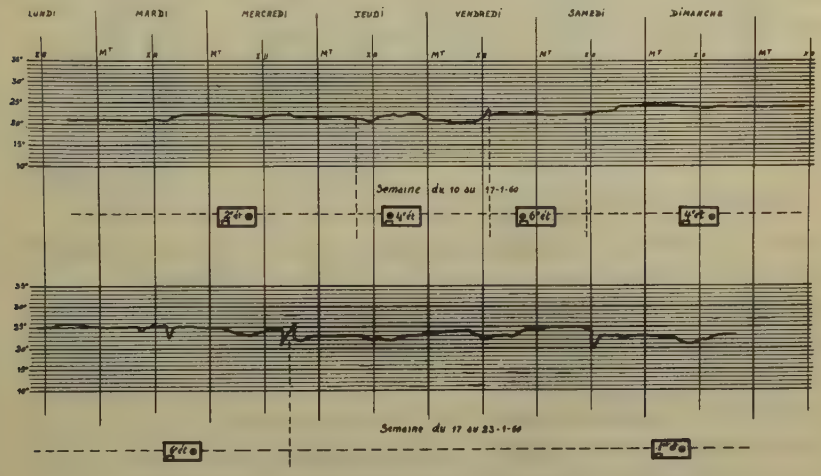


Fig. I

(*) Les semis obtenus sont remarquablement sains, les racines forment un feutrage blanc, très dru, d'odeur agréable, ne portant aucune trace de moisissure. C'est aujourd'hui une donnée classique que les états de carence ou de déséquilibre alimentaires favorisent l'installation de maladies parasitaires ou cryptogamiques (M. Ferrand, 6, 1954),

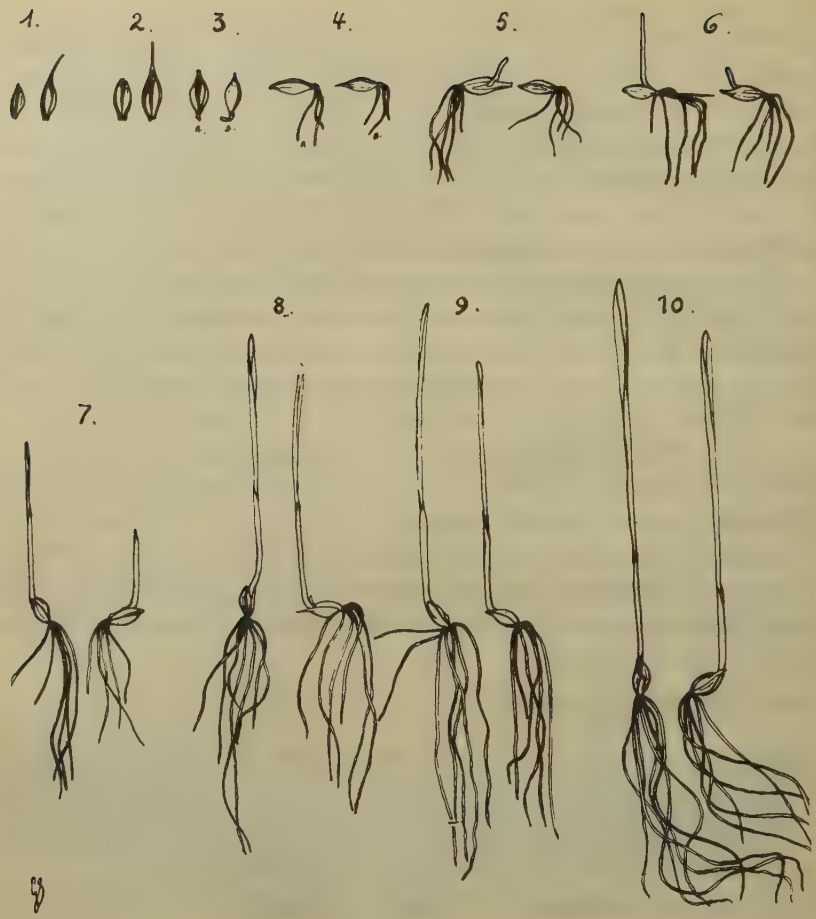


Fig. II

Aspects successifs de grains d'Orge, au cours de la prégermination et de la germination pendant 6 jours.

1. — 0 h. Grains secs.
2. — 24 h. dans l'eau.
3. — 48 h. dans l'humidité. Racines de 1 à 2 mm.
4. — 72 h. dans l'humidité. 3 racines de 12 à 15 mm.
5. — 1 jour germoir. 5 racines de 25-30 mm.
6. — 2 jours germoir. 5 à 6 racines de 25-30 mm coléoptile de 10 à 25 mm.
7. — 3 jours germoir. 5 à 6 racines de 35-60 mm tige de 5-6 cm.
8. — 4 jours germoir. 6 à 7 racines de 60-80 mm tige de 10 cm.
9. — 5 jours germoir. 6 à 7 racines de 70-80 mm tige de 11 cm.
10. — 6 jours germoir. 6 à 7 racines de 80-90 mm tige de 11 à 12,5 cm.

L'étude complète de l'évolution biochimique des grains en germination : poids frais et secs, glucides, lipides, protides, sels minéraux, sera publiée ailleurs.

Dans la présente note, nous suivrons l'évolution des chlorophylles, caroténoïdes (provitamines A), vitamines E, B_{12}, B_6, C, niacine (acide nicotinique) et acides pantohéniques, à différents moments de la germination.

Les Chlorophylles.

On a dosé séparément les chlorophylles *a* et *b* dans des échantillons prélevés dans les bacs de culture aux différents jours et à la même heure chaque jour.

Il a été tenu compte de la situation des plantules par rapport à la lumière artificielle centrale qui surplombe chaque bac. Les résultats de ces dosages figurent au tableau II. Chaque chiffre représente la moyenne de 4 analyses.

De ces nombreuses analyses, plusieurs faits ressortent bien clairement.

En éclairage direct les chlorophylles *a* et *b* augmentent régulièrement jusqu'au 5e jour. A ce moment, les plantules touchent le tube Phytor. Celui-ci devient ineffectif et après le 6e jour, les teneurs en chlorophylles diminuent considérablement, de 532.67 mgr. à 335.77 mgr. pour 100 gr. sec.

En éclairage latéral, c'est également après le 5e jour qu'apparaît la déficience en chlorophylle.

Il en résulte que la localisation des plantules, latéralement à l'éclairage médian, provoque une diminution du contenu en chlorophylles des feuilles et par conséquent un affaiblissement du rendement photosynthétique en aliments trophiques, sucres, graisses, protéines. Comme on sait l'interdépendance des métabolismes des chlorophylles, des caroténoïdes, des vitamines E et K, il est nécessaire que la surface des bacs de culture soit éclairée uniformément, si l'on désire obtenir un rendement maximum dans ces deux aspects des biosynthèses.

Cette seule évaluation des teneurs en chlorophylles des plantules situées sous le tube lumineux et de celles qui sont situées latéralement, suffit pour faire comprendre les différences qui existent entre des plantules venues dans un germoir bien éclairé et celles qui ont

grandi dans la lumière diffuse d'un germoir ordinaire non pourvu d'éclairage horticole au point de vue des activités nutritionnelles des microaliments.

TABLEAU II

Teneurs en chlorophylles a *et* b *exprimées en mgr aux différents jours de germination de l'orge*

Jours de germination	Nature des chloroph.	Pour 100 gr frais		Pour 100 gr sec	
		sous tube Phytor	en éclairage latéral	sous tube Phytor	en éclairage latéral
1	*a*	10,41	6,53	77,59	52,5
	b	3,2	2,13	24,55	12,01
	total	13,61	8,66	102,14	64,51
2	*a*	20,85	9,06	201,57	94,47
	b	5,85	1,86	45,75	19,13
	total	26,7	10,92	247,32	113,6
3	*a*	23,93	10,03	262,29	104,2
	b	08,36	3,50	81,56	36,04
	total	32,29	13,53	343,8	140,24
4	*a*	27,92	15,00	291,89	191,5
	b	8,06	3,66	83,72	41,2
	total	35,98	18,66	375,61	232,7
5	*a*	40,29	16,91	415,36	171,31
	b	15,20	4,98	117,31	58,81
	total	55,49	21,89	532,67	230,11
6	*a*	28,45	19,83	259,79	144,78
	b	8,95	3,70	75,98	39,60
	total	37,40	23,53	335,77	184,38

(Photo R. Sauveur)

Fig. III.

Un bac au 5e jour.

On distingue au centre du bac la coloration vert-bleu qui correspond à la végétation des plantules d'orge sous l'éclairage directeur du tube Phytor ; les feuilles éclairées plus faiblement sous une lumière latérale sont moins vertes de part et d'autre.

Vitamines liposolubles :

Vitamines E.

Des dosages de vitamine E (tocophérol) ont été effectués sur des plantules d'orge après 3 et 5 jours de germination. Comme l'éclairage par tube Phytor est central, il en résulte que les plantes au centre du bac de culture sont, nous l'avons dit, beaucoup mieux éclairées que celles des bords. Nous avons donc prélevé nos échantillons au centre et au bord des bacs et nous avons effectué les mesures comparativement sur ces deux échantillons.

TABLEAU III

Teneur en vitamine E (*tocophérol*) *exprimé en mgr.*
(*chaque chiffre représente la moyenne de* 4 *analyses*).

Jours de germination	Pour 100 gr frais		Pour 100 gr sec	
	sous tube Phytor	en éclairage latéral	sous tube Phytor	en éclairage latéral
3 10.33 % de mat. sèche	1,342	0.339	13,005	3.552
5 9.95 % de mat. sèche	1,404	0.417	14,116	4.025
0 grains non germés 89.2 % de poids sec	1,517		1,7	
	Lumière naturelle diffuse			
5 sans lumière artificielle ; 7.85 % de poids sec			4,6	

Les résultats sont inscrits au tableau III où figurent également les analyses des plantules de 5 jours ayant poussé dans un germoir éclairé par la lumière naturelle diffuse.

Nous insistons sur le fait que la vitamine E n'existe pas de manière appréciable dans les grains secs ; par contre, elle se trouve abondamment dans les jeunes plantes vertes bien éclairées, 14.116 mgr. % sec au 5e jour. Les plantules de 5 jours ayant vécu dans un germoir à la lumière naturelle diffuse contiennent environ 3 fois moins de vitamine E.

Pour des raisons chimiques, les vitamines E dépendent du métabolisme chlorophyllien : une partie de la molécule de chlorophylle entre dans la composition des vitamines E. On peut dire : pas de chlorophylle, pas de vitamine E.

Les chiffres 13-14 mgr. de vitamine E sous éclairage direct du tube Phytor, sont supérieurs à ceux que donne une herbe jeune de prairie : 9,8 à 10 mgr. (d'après Hennaux, Antoine et Lecomdte). A noter aussi que la vitamine E est fragile et qu'elle disparaît rapidement ; dans un bon foin, elle titre entre 4 à 5 mgr. % ; dans l'herbe ensilée, 6 à 7 mgr.%(*). Ainsi donc, les plantules d'orge venues sous lumière directe du tube Phytor en germoir sont *incontestablement précieuses au point de vue de l'apport des vitamines E.*

L'influence de ces complexes sur le développement des embryons est aujourd'hui reconnue. Il faut bien remarquer qu'ils ne représentent pas des hormones sexualisantes, mais bien des vitamines de fertilité.

Caroténoïdes — Provitamine A.

Le métabolisme des caroténoïdes est lié, dans les végétaux, à celui des chlorophylles, la richesse en provitamine A dépend de l'intensité de la photosynthèse.

La vitamine A est liposoluble (comme les vitamines D et E). Elle est le facteur antixérophtalmique. Elle est absolument néces-

(*) Les huiles naturelles non raffinées contiennent de fortes quantités de vitamines E :

huile de germe de blé	270 mgr./100 gr.
huile d'arachide raffinée	61 mgr./100 gr.
beurre	2 mgr./100 gr.
fois de veau	1 mgr. 3/100 gr.
lait	0 mgr. 1

(chiffres extraits de J. E. Courtois et R. Perles, 5, 1959).

saire à l'équilibre de croissance des animaux (équilibre visuel et épithélial, résistance aux infections, fertilité en liaison avec la vitamine E). La carence en vitamine A amène l'avortement.

Tbaleau IV

Teneur en caroténoïdes totaux exprimés en mgr.
(chaque chiffre représente une moyenne de 4 analyses)

Jours de germination des grains d'orge	Pour 100 gr frais		Pour 100 gr sec	
	sous tube Phytor	éclairage latéral	sous tube Phytor	éclairage latéral
1 j.	4.72	3.8	35.3	29.95
2 j.	4.37	4.5	41.82	46.15
3 j.	5.47	4.3	53.77	45.76
4 j.	7.05	5.6	86.86	49.61
5 j.	9.13	5.3	101.97	54.96
6 j.	8.70	4.7	84.33	59.6

Comme pour la vitamine E, nous avons effectué le prélèvement de matériel frais directement sous la lumière Phytor et sur les bords moins éclairés des bacs de culture. Les dosages ont été effectués sur des plantes ayant germé de 1 à 6 jours. Le tableau IV donne les chiffres obtenus.

Les premiers jours, les teneurs en caroténoïdes sont fort semblables dans les plantes de toute la surface des bacs de culture ; mais au 3e jour, les jeunes pousses sont déjà bien vertes au centre ; la teneur en caroténoïdes va croissant et dépasse largement les concentrations trouvées sur les bords mal éclairés de la culture. Comme les chlorophylles, les caroténoïdes y subissent à partir du 5e jour une diminution fort nette dans les deux régions d'éclairage par suite, comme nous l'avons dit, de l'augmentation de la taille des plantules qui voilent la lumière.

Ces dosages comparés aux données de la littérature montrent nettement l'importance d'un éclairage adéquat pour la synthèse de la provitamine A_3.

Vitamine A dans :

Foin : 0,5 à 0,6 mgr. pour 100 gr. sec.

Silage d'herbes : 15 mgr. pour 100 gr. sec. (Hennaux et all.).

Plantules d'orge : 101.97 mgr. pour 100 gr. sec (après 5 jours, dans germoir éclairé).

Vitamine K :

Nous n'avons pas dosé la vitamine K (phylloquinone), antihémorrhagique, car, suivant les raisons biochimiques qui valent pour les vitamines A et E, on sait que le contenu en vitamine K évolue parallèlement à celui des chlorophylles.

La vitamine K n'existe pas en quantité dosable dans les grains d'orge, blé ou avoine non germés tandis que dans les feuilles vertes des mêmes plantes on en trouve de 200 à 500 U. I. (unités internationales) par gr. de substance sèche (M. Florkin, 7, 1959).

Vitamines hydrosolubles :

Les dosages de vitamines hydrosolubles ont donné les résultats figurés au tableau V. Ils sont effectués sur des plantes ayant germé pendant 5 jours. L'action de ces vitamines sur l'organisme animal est essentielle aussi bien que celle des vitamines A et E (tocophérol) analysées plus haut.

Vitamines B_{12}.

La vitamine B_{12} a été trouvée en quantités très appréciables dans les plantules d'orge éclairées par tube Phytor au 5e jour de la germination.

La vitamine B_{12} contient du cobalt qui est nécessaire pour la formation des globules rouges et prévient les dégénérescences hémorrhagiques des reins chez les animaux dont le régime est carencé en groupe méthyl (CH 3). La vitamine B_{12}, comme l'acide folique, intervient dans la biosynthèse d'acides aminés essentiels contenant des groupes méthyl (méthionine). Elle est donc une substance de croissance obligatoire (A. P. F. ou „Animal Protein Factor") pour le métabolisme des protéines, c'est-à-dire la croissance de l'organisme.

TABLEAU V

Teneurs en vitamines hydrosolubles de l'orge germé
(chaque chiffre représente la moyenne de 4 analyses)

Nom des vitamines	État des vitamines	au 5e jour de germination	
		sur 100 gr. frais en γ	sur 100 gr sec en γ
B_{12}	total	0.8	5.50
	libre	0.4	3.24
Niacine ou acide nicotinique	total	5.000 (5 mgr)	34.400 (34,4 mgr)
	libre	750	5.100
B_6 ou pyridoxine	total	1.480 (1 mgr 480)	10.200 (10,2 mgr)
	libre	0	0
C ou ac. ascorbique	total	7.800 (7 mgr 80)	53.700 (53,7 mgr)
	libre	—	—
acide panto-thénique	total	300	20.700 (20 mgr 7)
	libre	300	20.700

Pour les plantes germées en mauvais éclairage la teneur en vitamine C est beaucoup plus faible : 4 mgr 5 pour 100 gr frais.

Niacine (acide nicotinique).

La niacine existe en grande quantité dans les jeunes plantes d'orge après le 5e jour ; la germination en lumière y amène 5 fois plus de niacine que dans la même quantité d'orge non germé.

Or l'acide nicotinique est un facteur essentiel pour le métabolisme général des animaux ; il est aussi un facteur de la guérison de la pellagre (maladie épidermique souvent accompagnée de diarrhée et de troubles nerveux). Il est donc intéressant de constater que la germination amplifie largement le contenu cellulaire en niacine.

Vitamine B_6 (pyridoxine).

Cette vitamine se trouve abondamment représentée dans nos plantules ; elle est synthétisée dans les végétaux verts et on la

retrouve dans les œufs, le lait. Elle est un facteur essentiel pour le métabolisme des acides aminés, c'est-à-dire des protéines et du tryptophane ; elle agit aussi sur le fonctionnement des reins. De plus, la carence en vitamine B_6 est chez les animaux associée à l'anémie, à des troubles nerveux et épidermiques (acrodynie).

Vitamine C (acide ascorbique).

Parmi les animaux supérieurs, il semble que les primates et les cobayes soient incapables de la synthétiser. Elle n'existe pas dans les grains secs, mais bien dans les grains germés, comme aussi dans les fruits et les végétaux verts.

Les plantules au 5e jour contiennent 53 mgr. 7 d'acide ascorbique pour 100 gr. sec.

Pour les plantes germées en mauvais éclairage, la teneur en vitamine C est beaucoup plus faible : 4.500 mgr pour 100 gr frais au lieu de 7 mg 80 sous tube Phytor.

La vitamine C est, on le sait depuis longtemps, le facteur anti-scorbutique spécifique.

Acide pantothénique.

Enfin, l'acide pantothénique représente 20 mgr. dans le poids sec de 100 gr. d'orge au 5e jour de germination.

Il est le constituant actif du Coenzyme A. Il se forme dans les végétaux verts et se retrouve dans les œufs, le lait. Les animaux ne peuvent le synthétiser.

La carence en acide pantothénique se traduit expérimentalement par une dépigmentation des poils, des cheveux, par des symptômes de dermatite, des troubles dans le fonctionnement de l'adrédaline.

Il faut remarquer que tous ces facteurs à côté du rôle spécifique qu'ils jouent dans certains phénomènes agissent aussi comme co-facteurs dans d'autres phénomènes : par exemple, l'acide pantothénique intervient comme curatif, à côté des vitamines spécifiques, dans le beriberi (carence en vitamine B_1), la pellagre (carence en acide nicotinique).

Conclusion

Les dosages des chlorophylles, des vitamines liposolubles, A, E et des vitamines hydrosolubles, B_{12}, acide nicotinique, vitamine B_6,

vitamine C, acide pantothénique, ont été pratiqués sur des plantules d'orge issus de la germination de grains en germoir avec lumière artificielle de deux intensités et, dans certains cas, avec lumière naturelle diffuse.

D'une part, les chlorophylles apparaissent en quantités notables à la lumière dès le 3e jour et au prorata de l'intensité lumineuse Ces chorophylles déclanchent, par leur action photosensibilisatrice, la synthèse non seulement de produits trophiques, comme les sucres, mais aussi de certaines vitamines comme A, E et K qui sont liées structurellement aux molécules des chlorophylles.

D'autre part, les vitamines hydrosolubles, qui n'existent guère dans les grains secs ou qui s'y trouvent à l'état inactif comme la vitamine B_6, ont été mises en évidence de manière appréciable dans les plantules ayant poussé à la lumière dès le 5e jour de la germination. Leur concentration dans les tissus est en rapport avec l'intensité de la lumière disponible. Pour l'acide nicotinique on constate qu'il en existe dans les plantules 5 fois plus que dans les grains non germés.

Aujourd'hui que le rôle essentiel joué par les vitamines dans la nutrition et le développement des animaux est connu, il est utile d'insister sur l'importance de l'éclairage des germoirs dont l'utilisation se répand largement en Europe et en Amérique afin de fournir aux animaux (bétail et volaille) une ration minimum de verdure pendant les périodes où la pâture est impossible.

Les auteurs remercient très vivement Madame El Tannir-Lomba pour son aide dans les analyses spectrophotométriques et Mr. Parmentier pour la mise au point du système des cultures.

Institut de Botanique
de l'Université de Liège
(*Laboratoire de Physiologie Végétale et Centre de Recherches des Hormones Végétales I. R. S. I. A.*)

Summary

Barley seedlings have been grown during the 6 first days of germination under artificial light (horticultural tubes Phytor C. R. H. Lg.) and intermittent aquiculture, in a special type of growing room. The content of the leaves in chlorophylles, vitamines A, B_1, B_6, B_{12}, C, pantothenic acid and nicotinic acid, have been analysed day by day. The seedlings obtained by this method of culture are perfectly normal and useful for animal nutrition.

BIBLIOGRAPHIE.

(1) R. Bouillenne et M. Fouarge, Étude d'un nouveau type d'éclairage fluorescent pour la culture en serre. *Bull. Hort. Liège*, **8**, 3, 1953.

(2) R. Bouillenne et M. Fouarge, La lumière artificielle en horticulture. Les tubes Phytor adaptés à la croissance des végétaux. — Report of the XIVth Intern. Horticultural Congress, Netherlands, 1955. *Actes du Congrès de Caen*, A. F. A. S., 1955.

(3) R. Bouillenne, Phytotron, appareil à faire des climats ; son utilité. Conférence donnée à la Tribune du Groupe XIII (Conditionnement d'Air) de Fabrimétal, le 3 décembre 1958. *La Revue : Chaleur et Climat.*

(4) P. Chouard, Culture sans sol. *La Maison Rustique*, rue Jacob, 26, Paris VI.

(5) J. E. Courtois et R. Perles, Précis de chimie biologique, I, p. 236, 1959 (Masson et Cie, Paris).

(6) M. Ferrand, L'analyse des plantes et la pratique horticole dans *Analyse des plantes et problèmes des engrais minéraux*. VIIIe Congr. Intern. Botan. Paris, 1954 (I. R. H. O. Paris 16).

(7) M. Florkin, Évolution biochimique. Desoer, Liège, 1959.

(8) J. S. Fruton et Sofia Simmonds, General Biochemistry. Willey and Sons N. Y., 1953.

(9) M. Homès et J. Ansiaux, L'acquiculture, technique de production commerciale. I. R. S. I. A., Compte-rendus de recherches **3**, juin 1950, Bruxelles.

(10) W. S. Iljin, Metabolism of plants affected with lime induced chlororis (Calciose). *Plant and Soils*, **4**, 1, 10/28, 1952.

(11) Lagatu et Maume, Diagnostic de l'alimentation du végétal par l'évolution chimique d'une feuille convenablement choisie. (C. R. 182 : 653) 1926.

(12) T. Wallace, The diagnosis of mineral deficiencies in plants by visual symptoms. *His majesty's stationery office*, London, 1951.

IMPRIMERIE GEORGE MICHIELS, S. A., 6 RUE DE LA PAIX, LIÈGE
IMPRIMÉ EN BELGIQUE

Bull. Soc. Royale Sciences Liège, 30e année, nº 9-10 1961, pp. 458-468

PHOTOPÉRIODISME ET INTENSITÉ LUMINEUSE CHEZ SALVIA SPLENDENS, VAR. FEU DE LA SAINT-JEAN (*)

par Th. GASPAR
Assistant à l'Université de Liège

RÉSUMÉ

Nous avons cultivé *Salvia splendens Sello*, var. Feu de la Saint-Jean, dans diverses photopériodes et sous différentes intensités lumineuses, en Phytotron.

Nous montrons que cette plante, qui se comporte comme une plante de jours longs sous 4.000 lux d'intensité lumineuse, peut cependant fleurir normalement en jours courts de 8, 7 et 6 heures quand on augmente l'intensité lumineuse jusqu'à 10.000 lux.

Introduction

R. Crawford (1959, 1961) et R. Bouillenne (1960) ont montré que *Salvia splendens Sello*, var. Feu de la Saint-Jean, cultivée dans les conditions habituelles du phytotron de Liège (4.000 lux d'intensité lumineuse) se comporte comme une plante de jours longs : elle fleurit rapidement en 16 heures de jour, beaucoup plus tard en 8 heures et jamais en 7 heures.

Le but de notre travail est de voir comment réagit cette plante en jours courts de 6, 7 et 8 heures quand on augmente l'intensité lumineuse et de pouvoir ainsi en confronter les réactions photopériodiques avec les effets du bilan énergétique.

Matériel et Méthodes :

a. Les graines de *Salvia splendens*, var. Feu de la Saint-Jean, nous sont fournies par la maison Belot-Étienne et Cie, S. A., à Liège. Semées dans les conditions décrites ci-dessous, elles germent en

(*) Présenté par R. Bouillenne, le 18 mai 1961.

général en une dizaine de jours. Quatre à cinq jours plus tard, les plantules ont deux feuilles opposées bien étalées. La formation des feuilles, par paires, se poursuit à un rythme plus ou moins rapide le long d'un tige tétragone. Après un certain nombre de paires de feuilles, nombre qui dépend des conditions expérimentales, apparaît le bouton floral terminal. Ce bouton, si les conditions sont favorables, donne un épi formé de verticillastres disposés deux par deux à chaque niveau. L'épi compte de deux à dix-huit niveaux. Le verticillastre est souvent réduit à une fleur pédicellée ; si les conditions sont favorables, il développe jusqu'à trois fleurs, de sorte que chaque niveau de la hampe florale peut compter deux ou six fleurs.

Un peu avant l'apparition du bouton floral, les bourgeons axillaires des feuilles des nœuds supérieurs se réveillent.

b. Les graines sont semées sur terreau stérilisé composé de deux tiers de terre de bruyère et d'un tiers de terreau de jardin. Les plantules sont repiquées en pots (une plante par pot) de sept centimètres de diamètre (dans le même terreau) lorsqu'elles montrent bien visiblement leur première paire de feuilles.

Les expériences se déroulent dans les chambres conditionnées du phytotron (20° C., 80 % d'humidité relative ; pour description, voir R. Bouillenne & M. Bouillenne-Walrand, 1950). L'éclairage est fourni par les tubes Phytor C. R. H. Lg. (Bouillenne & Fouarge, 1953), tubes nous donnant une intensité lumineuse de 4000 à 10.000 lux selon les expériences.

Les plantes sont arrosées copieusement, une fois par jour. Tous nos chiffres sont des moyennes sur dix plantes au moins.

Expérience I

Croissance, développement et floraison de Salvia splendens en 16, 8 et 7 heures de jour sous 4.000 lux d'intensité lumineuse.

Nous avons mesuré régulièrement la taille des plantes et compté le nombre de paires de feuilles dans les trois photopériodes. Les résultats sont portés dans le tableau ci-dessous et dans les diagrammes de la fig. 1. Ils expriment une croissance plus rapide des plantes en jours longs qu'en jours courts. Ils montrent aussi, pour les plantes de 16 et 8 heures de jour, qu'à partir d'un certain moment, le nombre de nœuds foliaires est stationnaire : pour ces plantes, la croissance végétative est terminée lorsque le bouton floral terminal est présent et va se développer.

Tableau I

Jours après semis	Taille (cm.)			Paires de Feuilles		
	16 h.	8 h.	7 h.	16 h.	8 h.	7 h.
31	3,7	3,6	2,7	3,7	2,7	2,1
37	5,3	4,9	3,3	5,0	4,0	3,1
44	6,5	5,8	4,3	6,1	4,8	3,6
51	7,8	7,5	6,7	6,4	6,1	5,2
58	9,5	8,7	8,3	6,4	7,3	6,0
65	11	10,1	10,0	6,4	8,7	7,3
72		11,6	11,4		9,6	8,1
86		16,0	16,2		10,4	10,8
93		16,7	16,8		10,9	12,0
101		17,0	17,5		10,9	13,0
107			18,7			13,2
115			19,5			14,5
123			19,9			15,4
128			20,6			16,5
135			21,6			18,2
144			23,9			19,0
150			26,0			20,3
157			28,1			21,5
163			30,0			22,6
171			33,6			24,0

En 16 heures de jour, les boutons floraux sont discernables 37 jours après le semis, lorsque les plantes ont atteint 6-7 nœuds foliaires (Fig. 2). Le bouton floral grossit rapidement, rougit et développe en 20-25 jours une hampe florale qui porte jusqu'à 18 niveaux de fleurs (Fig. 3).

Lorsque la hampe florale a presque terminé son évolution, les bourgeons aisselliers réveillés des nœuds foliaires 4 ou 5 grandissent et donnent deux axes latéraux qui fleurissent plus tard.

En 8 heures de jour les boutons floraux sont discernables vers le 85e jour après le semis, lorsque les plantes ont atteint 11-12 nœuds foliaires. Mais le bouton floral n'évolue pas aussi rapidement qu'en 16 heures de jour. Il reste latent pendant 15 jours au moins avant de donner, dans 7 cas sur 35, une courte hampe florale avec 6 niveaux de fleurs au maximum ; dans les autres cas, le bouton rougit,

développe quelques fleurs qui tombent rapidement ; autrement dit, ce bouton avorte : toutes ses parties se dessèchent et tombent (Fig. 4).

Une paire de bourgeons aisselliers supérieurs se développe rapidement et donne deux axes latéraux qui bientôt dépassent le sommet principal (Fig. 4).

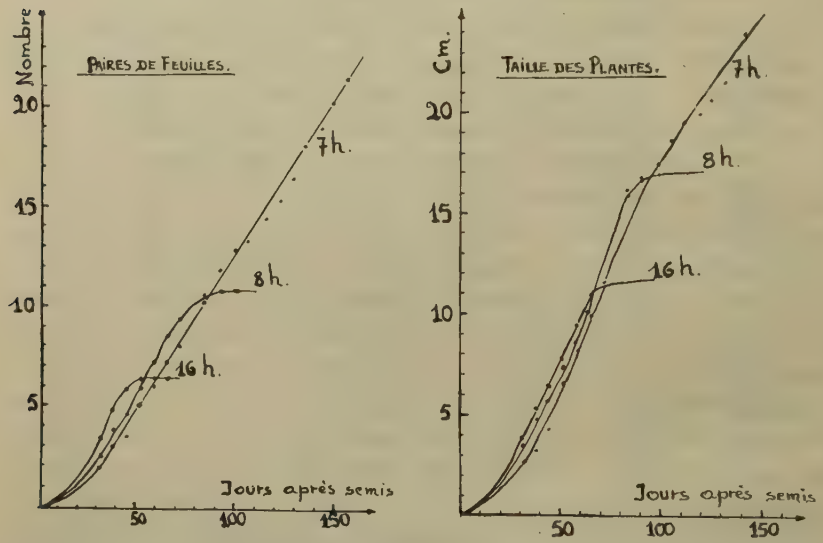


Fig. 1. — Courbes de croissance de *Salvia splendens* dans les photopériodes 16 heures, 8 heures et 7 heures de jour dans les conditions du phytotron (4000 lux, 20°C. et 80 % d'humidité).

En 7 heures de jour les plantes ne fleurissent pas. Après 7 mois, elles n'ont pas donné même un bouton floral avorté. Elles ont atteint 26 nœuds foliaires et continuent leur évolution végétative.

Ces résultats confirment ceux de Crawford (1961).

Expérience II.

Transfert de plantes de 7 heures de jour-4000 lux en 7 heures de jour-7000 lux.

Dès la germination, la pâleur et la fragilité des plantes de 7 heures de jour, sous 4000 lux, comparées à celles de 8 et 16 heures de jour, est remarquable. Nous avons pensé que l'anémie de départ des plantes de 7 heures de jour était due à un manque d'énergie lumineuse.

Des plantes de 7 heures de jour-4000 lux, âgées de 60 jours, mesurant 10 centimètres de haut et ayant une moyenne de 7,3 nœuds foliaires sont transférées en 7 heures de jour-7000 lux.

(*Photo R. Sauveur.*)

Fig. 2. Plante de 16 heures de jour, âgée de 39 jours montrant le début de l'inflorescence. Remarquer le réveil des bourgeons axillaires.

Sous l'intensité lumineuse de 7.000 lux, les plantes ne montrent pas de croissance plus rapide que celles qui restent sous 4.000 lux

Fig. 3. Plantes respectivement de 16 heures, 8 heures et 7 heures de jour, sous 4000 lux, après 66 jours de culture.

Fig. 4. Plantes de 8 heures de jour, 114 jours après le semis. Remarquer les hampes florales en voie d'avortement et le développement des axes latéraux.

(*Photos R. Sauveur.*)

mais trente jours après le transfert, les boutons floraux sont discernables. Les plantes ont atteint 12-13 nœuds foliaires et une hauteur moyenne de 17 centimètres.

Le bouton floral se développe normalement et produit une hampe florifère aussi importante qu'une hampe de 16 heures de jour sous 4.000 lux : elle porte jusqu'à 18 niveaux de fleurs (Fig. 5).

(*Photo R. Sauveur.*)

Fig. 5. Plantes âgées de 114 jours, respectivement de gauche à droite :
— deux plantes de 7 heures végétatives (4.000 lux).
— deux plantes de 7 heures (4.000 lux) transférées en 7 heures (7.000 lux) depuis 54 jours.

Expérience III.

Application d'une intensité lumineuse de 7.000 lux dès le semis en 7 heures de jour.

Les figures 6 et 7 illustrent la différence de croissance entre les plantes de 7 heures de jour sous 7.000 lux et les plantes de 7 heures de jour sous 4.000 lux. La différence s'est marquée très nettement dès la première paire de feuilles. Quand, en 7 heures-7.000 lux, les plantes ont différencié quatre paires de feuilles, les plantes de même âge, en 7 heures-4.000 lux, n'en n'ont différencié que deux. L'inégalité des hauteurs est aussi appréciable.

En 7 heures sous 4.000 lux, nous n'avons jamais constaté de

Fig. 6 : âgées de 50 jours.

Fig. 7 : âgées de 73 jours.

(*Photos R. Sauveur.*)

Séries de trois plantes cultivées :
— à gauche, en 7 heures-7.000 lux.
— à droite, en 7 heures-4.000 lux.

floraison (expérience I) ; en 7 heures sous 7.000 lux, 73 jours après le semis, apparaissent des boutons floraux. Les plantes ont 11-12 paires de feuilles et mesurent 13 centimètres de haut. Il faut cependant 15 jours supplémentaires pour que toutes les plantes de la

série se présentent à ce stade. Le bouton floral ne se développe pas très rapidement. Il reste latent 15 jours au moins avant de donner, dans une dizaine de cas sur quarante, une courte hampe florale avec 5-6 niveaux de fleurs au maximum. Dans les autres cas, le bouton rougit, développe une courte inflorescence dont les pièces toutes serrées les unes contre les autres fanent puis tombent assez vite. Les rameaux axillaires grandissent et dépassent rapidement l'axe de l'inflorescence avortée.

Expérience IV.

Application d'une intensité lumineuse de 10.000 lux, dès le semis en 6 heures de jour.

Puisque *Salvia splendens* peut flurir en 7 heures de jour sous 7.000 lux, nous l'avons semé en 6 heures de jour, directement sous une intensité lumineuse de 10.000 lux.

La germination est normale mais le début de la croissance des plantules est très lent.

83 jours après le semis, les premières plantes présentent des boutons floraux. Elles ont atteint 11 nœuds foliaires et 12 centimètres de haut. La floraison est normale : elle développe une hampe portant 6-7 niveaux de fleurs en moyenne.

Les plantes témoins, sous 4.000 lux, ont 7 nœuds foliaires et 9 centimètres de haut. Elles sont végétatives.

Expérience V.

Application d'une intensité lumineuse de 10.000 lux, dès le semis en 8 heures de jour.

Cette expérience a deux buts : le premier, essayer, dans la photopériode 8 heures, en augmentant l'intensité lumineuse, d'avancer la floraison (diminuer le nombre de jours et de nœuds nécessaires à l'apparition des boutons floraux) et accroître son rendement (nombre de niveaux de fleurs) ; le deuxième, voir si en 8 heures sous 10.000 lux, le résultat sera le même qu'en 16 heures sous 4.000 lux.

Résultats : 55 jours après le semis, alors que les plantes ont atteint 7 nœuds foliaires et 9 centimètres de haut, nous constatons l'apparition des boutons floraux. La floraison est normale, abondante

même puisque la hampe florifère montre jusqu'à 18 niveaux de fleurs.

La floraison, en 8 heures-10.000 lux, est avancée par rapport à celle de 8 heures-4.000 lux : le 55e jour au lieu du 85e jour ; au 8e nœud au lieu du 12-13e ; 18 niveaux de fleurs au lieu de 6. Elle se produit comme en 16 heures-4.000 lux, au 8e nœud et avec la même intensité. Il a seulement fallu plus de temps en 8 heures-10.000 lux (55 jours) qu'en 16 heures-4.000 lux (37 jours) pour amener les plantes à la même maturation.

Discussion

L'expérience I, présentée seule, amène la conclusion : *Salvia splendens*, var. Feu de la Saint-Jean, est photopériodique, c'est une plante de jours longs : elle fleurit en 16 heures de jour, elle ne fleurit pas en 7 heures de jour (Crawford, 1959-1961).

L'expérience II montre qu'en augmentant l'intensité lumineuse, on peut faire fleurir *Salvia splendens* en jours courts de 7 heures.

Lorsque les plantes ont d'abord séjourné sous 7 heures, 4.000 lux, pendant 60 jours à partir du semis et qu'elles sont ensuite transférées en 7 heures, 7.000 lux, les boutons apparaissent au 90e jour et les inflorescences grandissent normalement (Exp. II). Mais un résultat troublant est obtenu dans le cas où *Salvia splendens* est soumis en 7 heures de jour à une intensité de 7.000 lux, à partir du semis (Exp. III). La floraison se présente d'une façon déficiente et, après environ 3 mois, 75 % des inflorescences avortent.

La floraison obtenue en 7 heures d'éclairement quotidien, par le transfert en 7.000 lux d'une plante maintenue pendant 60 jours sous 4.000 lux et qui n'aurait pas fleuri si elle y était restée, est difficile à interpréter, par rapport au fait que sous 7.000 lux depuis le semis la floraison est anormale et incomplète.

L'expérience IV pourrait orienter l'expérimentation que nous nous proposons, puisque une intensité lumineuse de 10.000 Lux aboutit même en 6 heures de jour à une floraison normale.

L'expérience V prouve qu'en jours courts de 8 heures sous 10.000 lux, la floraison a lieu comme en jours longs de 16 heures sous 4.000 lux : les plantes ont 7 paires de feuilles et une hampe florale équivalente de part et d'autre. Seul, le nombre de jours nécessaires à l'apparition des boutons floraux est différent, ce que nous attribuons à l'effet de la photopériode elle-même.

Il ne faut donc pas considérer *Salvia splendens*, var. Feu de la Saint-Jean, comme une plante de jours longs absolue mais plutôt comme une plante de jours longs préférante. Chez cette plante, la rapidité et le degré de floraison vis à vis de la lumière blanche sont liés à deux facteurs : la photopériode d'une part et l'intensité lumineuse, d'autre part.

Borthwick et Parker (1938) écrivent que l'initiation florale de plantes de « Soybean Biloxi » n'a lieu, en photopériode de 8 heures de jour, que si l'intensité lumineuse dépasse 100 pieds-bougie.

De Zeeuw (1953) obtient la floraison de Perilla, une plante de jours courts, avec 18 heures de lumière par jour et même en lumière continue à condition que les plantes soient gardées dans une lumière de faible intensité.

Bouillenne (communication personnelle) ne parvient cependant pas à faire fleurir ni même à allonger l'axe de la rosette d'*Hyoscyamus niger* en jours courts en augmentant l'intensité lumineuse jusqu'à 10.000 lux.

Ces quelques résultats rassemblés indiquent clairement que la photopériode est liée à certaines exigences quantitatives en énergie lumineuse.

Laboratoire de Physiologie Végétale,
Institut Botanique, Université de Liège.
(Recherches subsidiées par l'I.R.S.I.A.).

BIBLIOGRAPHIE

Bouillenne, R. et Bouillenne-Walrand, M. (1950), Le phytotron de l'Institut Botanique de l'Université de Liège. Archives de l'Institut de Botanique, Liège, **20**, 2.

Bouillenne, R. et Fouarge, M. (1953). Étude d'un nouveau type d'éclairage fluorescent en serre (Phytor ICRHLg) pour la culture en serre. *Bul. Hort., Liège*, **8**, 3.

Bouillenne, R. (1960), Quelques aspects actuels de la physiologie de la mise à fleurs. *Bull. Cl. Sc., Acad. Roy. Belg.*, 5e série XLVI, 7.

Borthwick, H. A. and Parker, M. W. (1938), Photoperiodic Perception in Biloxi Soybeans. *Bot. Gaz.*, **100**, 374.

Crawford, R. M. M. (1959). Respiration and Photoperiodism. *Bull. Soc. Roy. Sc. Liège*, **1-2**, p. 54-55.

Crawford, R. M. M. (1961). The photoperiodic reaction in relation to development in Salvia splendens. *Annals of Botany*, **25**, 94.

Zeeuw, D. De (1953), Flower initiation and light intensity in Perilla. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch. Amsterdam*, C **56**, 418-422.

IMPRIMERIE GEORGE MICHIELS, S. A., 6 RUE DE LA PAIX, LIÈGE
PRINTED IN BELGIUM

Bull. Soc. Royale Sciences Liège, 30e année, nº 11-12 1961, pp. 489-495

ÉTUDE ANATOMIQUE ET HISTOCHIMIQUE DES RACINES D'EMINIA TAUB. (*)

par G. BERNIER,
Chargé de Mission F.U.L.R.E.A.C.

RÉSUMÉ

La structure anatomique des racines du genre *Eminia* Taub. est décrite. L'étude histochimique fait apparaître une accumulation importante de protéines dans les cellules du phellogène. Il est proposé d'assimiler ces protéines au complexe enzymatique amylolytique caractéristique de ces organes.

* * *

Dans un travail récent, G. Bernier et A. Lambrechts ont décrit la fabrication de la bière munkoyo au cours de laquelle les indigènes katangais liquéfient une pâte amylacée par la simple addition de quelques racines d'*Eminia*. M. et R. Bouillenne ont extrait l'agent actif de l'amylolyse et ont montré qu'il s'agissait d'un complexe enzymatique dont l'activité est comparable à celle de la Pangestine.

Dans le présent article, nous nous proposons d'étudier anatomiquement et histochimiquement les organes souterrains d'*Eminia* en vue de localiser avec précision ce complexe fermentaire.

Matériel et Techniques

Nous disposons de racines d'*Eminia holubii* (Hemsl.) Taub. récoltées en saison sèche au Katanga. Elles mesurent approximativement 30 cm. de long et 2 à 4 cm. de diamètre. Ce sont donc des organes âgés. Elles sont conservées quelques mois en terreau légèrement humide.

Débitées en petits fragments, elles sont traitées par divers fixa-

(*) Présenté par M. M. Bouillenne et Moureau, le 15 juin 1961.

teurs : le fixateur de Navachine, le fixateur de Brachet, le fixateur de Regaud, le formol, le formol salé de Baker.

Les objets sont ensuite enrobés dans la paraffine et sectionnés à diverses épaisseurs suivant la nature de la recherche : 10 à 15μ pour l'étude anatomique, 7μ pour l'étude histologique et histochimique, 20μ pour l'application du test de Millon.

Deux méthodes de coloration permettant de distinguer le bois du liber ont été utilisées pour la description anatomique des coupes : la méthode à la phloroglucine chlorhydrique et la double coloration au rouge congo — chrysoïdine.

La coloration par l'hématoxyline de Regaud a été employée pour l'étude histologique tandis que divers tests caractéristiques des protéines ont servi à la recherche histochimique : le test de Chèvremont et Frederic caractérisant les composés à fonction — SH (ce sont surtout des protéines), le test de Millon adapté par Baker (*) à l'histochimie révélant la tyrosine liée (c'est-à-dire la tyrosine faisant partie des molécules protéiniques), le test de Brachet mettant en évidence les acides ribonucléiques (ARN) et par conséquent les lieux de synthèse des protéines. L'amidon a été localisé par la réaction de Guilliermond.

Résultats

D'un point de vue anatomique, une coupe transversale dans les racines d'*Eminia* montre les tissus suivants en allant de la périphérie vers le centre :

— le suber ;

— le phellogène ;

— le phloème secondaire contenant des tubes criblés, dont certains sont obturés, des cellules parenchymateuses, des rayons libériens assez courts et des amas irréguliers et épars de fibres lignifiées semblables aux fibres du xylème ;

— le cambium peu abondant, ne constituant pas un cercle continu car il est interrompu au niveau du parenchyme horizontal ;

— le xylème secondaire très abondant et composé d'un grand nombre de couches concentriques de fibres ligneuses séparées

(*) Bien que l'enrobage à la paraffine ne soit pas conseillé dans le cas de cette technique, nous avons cependant obtenu des résultats très satisfaisants.

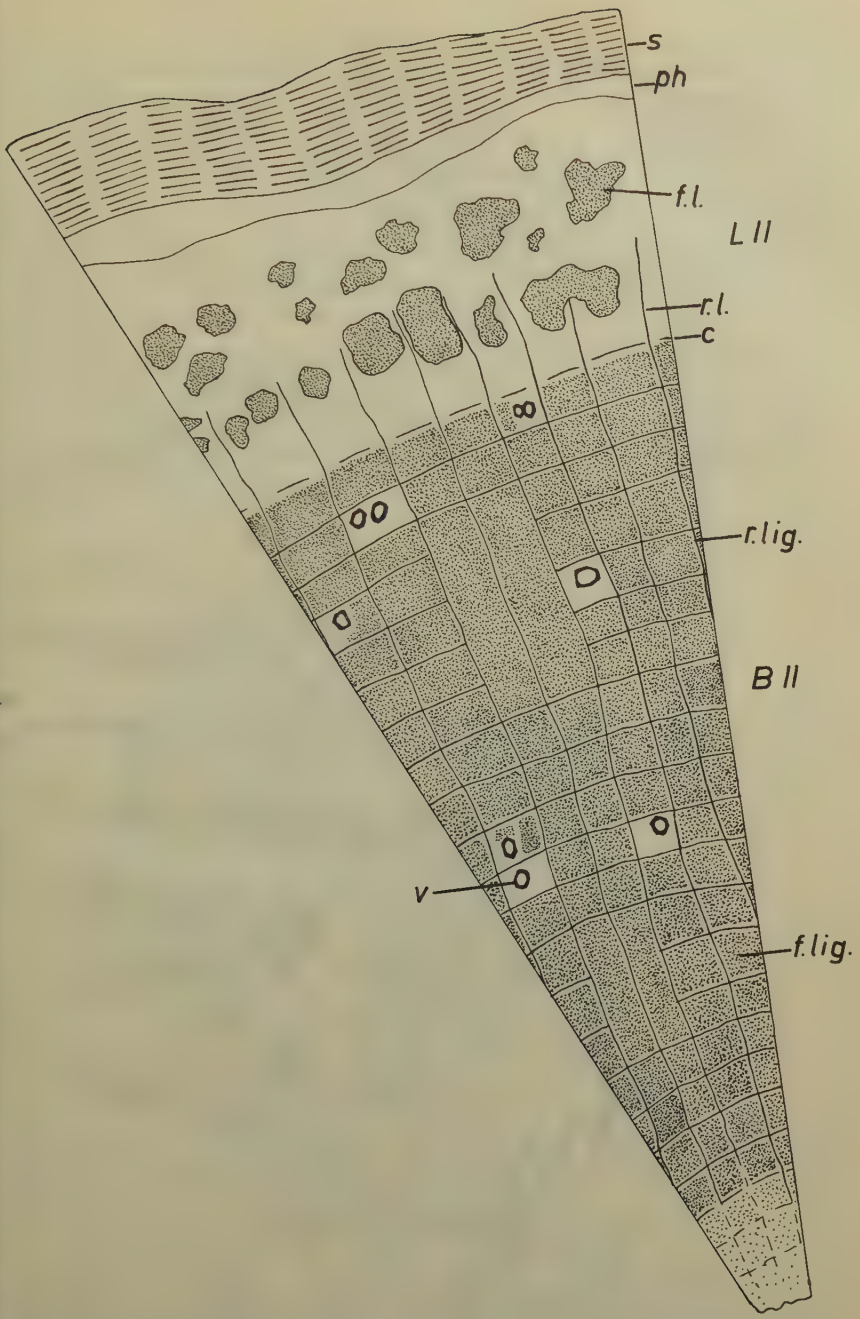


Fig. 1. — Schéma d'une coupe transversale dans la racine d'*Eminia* ($\times 15$). — s. : suber ; ph. : phellogène ; L II : liber secondaire ; f. l. : fibres libériennes ; r. l. : rayon libérien ; c. : cambium ; B II : bois secondaire ; r. lig. : rayon ligneux ; f. lig. : fibres ligneuses ; v. : vaisseau.

Les symboles ont la même signification dans les figures suivantes.

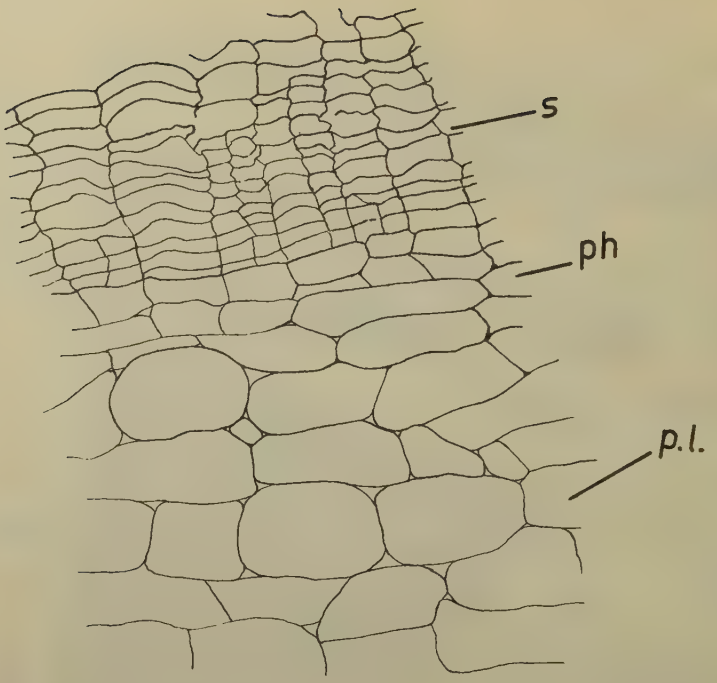


Fig. 2. — Région péridermique de la racine (× 115) — p. l. : parenchyme libérien.

Fig. 3. — Région cambiale de la racine (× 115). — l. o. : liber obturé.

par du parenchyme vertical ; de nombreux rayons ligneux s'étendant de la région cambiale au centre de la coupe interrompent la continuité des anneaux de fibres ; on trouve encore dans le bois secondaire quelques grands vaisseaux.

Au centre de la coupe, les éléments ligneux sont moins nombreux tandis que le parenchyme est plus abondant. Les rayons ligneux s'estompent progressivement. Mais dans aucun cas nous n'avons pu observer les pôles du bois primaire ni une moelle typique. La taille et l'âge des spécimens étudiés sont évidemment peu propices à l'observation des formations primaires.

L'organisation des divers tissus est schématisée dans la fig. 1. Les détails anatomiques caractéristiques des divers territoires de la coupe sont reproduits dans les fig. 2 à 4.

Fig. 4. — Un aspect du bois secondaire de la racine (× 100).

Quelques caractères anatomiques, tels que la présence possible de liber interxylémien, restent obscurs et ne pourront être éclaircis que par une étude ontogénique des racines, accompagnée d'observations réalisées sur des échantillons récoltés tout au long de l'année.

HISTOLOGIE VÉGÉTALE. — *Ontogénie du méristème apical de* Sinapis alba *L.* (*Crucifères*) *depuis la graine jusqu'à l'édification de l'inflorescence.* Note (*) de M. **Georges Bernier**, présentée par M. Lucien Plantefol.

L'ontogénie du méristème de *Sinapis alba* se fait en quatre phases. Après la phase d'hydratation, la phase végétative est caractérisée par l'activité latérale d'un anneau initial. Elle est suivie d'une phase préflorale très courte où l'apex se dédifférencie et grossit. Une zonation nouvelle réapparaît lors de la phase reproductrice suggérant un fonctionnement assez semblable à celui d'un anneau initial.

Le méristème apical de *Sinapis alba* a été étudié sur des plantes cultivées dans le phytotron de Liège. Les conditions écologiques réalisées étaient les suivantes : 20°C, 80 % d'humidité relative de l'air, 16 h journalières de lumière artificielle, d'intensité égale à 5 000 lx, donnée par des tubes Phytor C. R. H. Lg. Dans ces conditions, le cycle vital complet est extrêmement court : les plantes initient une dizaine de feuilles alternes durant les 10 premiers jours, puis sont mises à fleurs entre le 11^{e} et le 13^{e}; leur taille atteint alors seulement une dizaine de centimètres et, seuls, les cotylédons et les deux premières feuilles sont étalés. L'apparition des boutons floraux et l'ouverture des fleurs a lieu durant le premier mois de culture.

Dans la graine sèche, l'apex montre, sur le même diamètre, deux ébauches foliaires et, sur le diamètre perpendiculaire, le soubassement de la 3^{e} feuille. La coloration au vert de méthyle-pyronine permet de distinguer déjà une faible zonation : les zones latérales et, particulièrement le 3^{e} soubassement (*fig.* 1, *sf* 3), sont plus riches en acides ribonucléiques (ARN) que la zone axiale. Les nucléoles sont également plus volumineux dans les cellules des flancs (2,5 μ de diamètre) que dans les cellules axiales (1,7 μ).

Pendant les 13 jours qui suivent, c'est-à-dire jusqu'à la formation de l'inflorescence terminale, le méristème de *Sinapis* passe par quatre phases bien distinctes.

Au cours de la phase d'hydratation (1er et 2^{e} jours), aucun changement morphologique n'affecte l'apex où l'activité mitotique reprend lentement à la base des deux premières feuilles et dans les parties hautes de la moelle. L'hydratation rapide des cellules est marquée par un grossissement important des nucléoles qui demeurent cependant plus volumineux dans les zones latérales de l'apex (3,2 μ de diamètre contre 2,6 μ dans la zone axiale dans le cas de la figure 2). Les grains d'aleurone, qui encombraient les cellules entourant le point végétatif, sont dissous progressivement et redeviennent des vacuoles.

La reprise d'une activité mitotique intense, dès le 3^{e} jour, indique le début de la phase végétative. A ce stade, l'apex montre dans la zone axiale une *tunica* bisériée (*fig.* 3, *t*) et quelques cellules de *corpus* (*c*) dont

l'affinité pour la pyronine après le test de Brachet est très faible. Au-dessou le méristème médullaire (*mm*) est à peine ébauché.

De nombreuses divisions cellulaires ont lieu dans l'assise sous-épide mique au niveau du 3e soubassement et sont périclines. Elles soulèver le 3e initium foliaire (*fig.* 3, *in f* 3) dont les cellules s'enrichissent spécia lement en ARN tandis qu'à l'aisselle *af* 2 de la feuille de rang 2 quelqu cellules ont une teneur en ARN plus forte que dans la zone axiale. Peu après l'initium de la 4e feuille apparaît en regard du 3e primordium sur l'ax perpendiculaire aux deux premières feuilles. Une dizaine de feuilles seron ainsi successivement formées par chacun des deux centres générateurs partir du 3e au 9e à 12e jour.

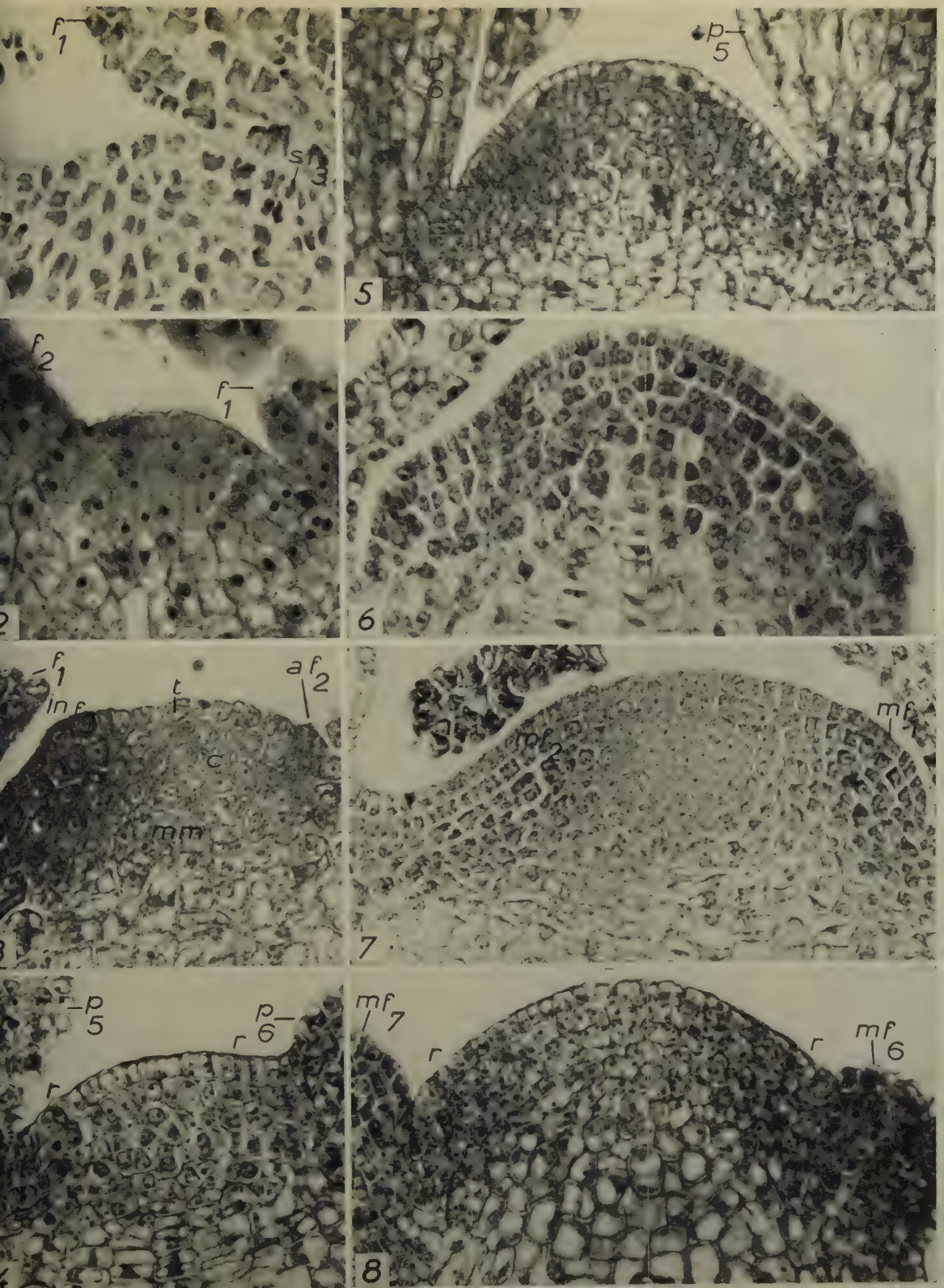
Après la surrection d'un primordium, et dès que la hauteur de celui-c est de 20 μ environ (*fig.* 4, *p* 6), le méristème apical, entamé par cett surrection, se régénère à l'aisselle du nouvel organe par de nombreuse mitoses anticlines (*fig.* 4, *r*, régénération avancée à l'aisselle de *p* 5 et débu tant à l'aisselle de *p* 6).

A la suite de cette régénération, l'apex reprend ses dimensions maxi males (*fig.* 5) et l'activité mitotique se ralentit : c'est une période de *repo relatif* [G. Bersillon (1)].

Le méristème montre, *dans cet état*, l'assise tunicale superficielle vacuo lisée *sur les flancs* comme au centre (*fig.* 5). Ce fait, constamment observé traduit la différenciation extrêmement rapide caractéristique de ce végéta Cependant la vacuolisation est plus accentuée dans les cellules apicale axiales que dans les cellules des flancs lors de l'initiation et de la régéné ration (*fig.* 4). De même, le chondriome est sensiblement punctiforme dan

Explication des figures (G × 290).

Fig. 1 (Test de Brachet) : Apex dans la graine sèche montrant deux ébauches foliaire *f* 1 et *f* 2, et une faible zonation marquée par l'affinité pour la pyronine du souba sement de la 3e feuille (*sf* 3). — Fig. 2 (Navachine, hématoxyline) : Apex durant la phas d'hydratation. Nucléoles de très fort diamètre mais cependant plus volumineux sur l flancs qu'au centre. — Fig. 3 (Test de Brachet) : Initiation de la 3e feuille (*in f* 3) dan un apex de 3 jours. Zone organogène très riche en ARN; zone axiale pauvre en ARN A l'aisselle (*af* 2) de la 2e feuille une zone de régénération possède une teneur moyenn en ARN. Région centrale constituée d'une *tunica* (*t*) bisériée, de quelques cellules d *corpus* (*c*) et d'une ébauche de méristème médullaire (*mm*). — Fig. 4 (Navachin hématoxyline) : Régénération latérale (*r*) de l'apex par mitoses anticlines à l'aissel des primordiums de rang 5 et 6 (*p* 5 et *p* 6). Vacuolisation importante des cellules tun cales axiales et présence de quelques mitoses à la base du *corpus* et sur les bords d l'anneau initial. — Fig. 5 (Navachine, hématoxyline) : Repos relatif succédant à la rég nération d'un apex après la surrection de *p* 5 et de *p* 6. Assise tunicale superficiel fortement vacuolisée sur toute son étendue. — Fig. 6 (Navachine, hématoxyline) Apex à la fin de la phase préflorale. Quatre assises régulières. Accroissement en largeu et en hauteur de l'apex. — Fig. 7 (Test de Brachet) : Initiation des premiers méristèm floraux (*mf* 1, *mf* 2) par des mitoses périclines de la 3e assise, et forte teneur en AR de cette zone organogène. Réveil d'une zonation rappelant celle observée dans l apex végétatifs (voir *fig.* 3). — Fig. 8 (Navachine, hématoxyline) : Régénératio latérale (*r*) de l'apex reproducteur par mitoses anticlines situées à l'aisselle des mér stèmes floraux 6 et 7 (*mf* 6 et *mf* 7).


f 1
s 3
p 6
p 5
5
f 2
f 1
6
f 1
in f
t
af 2
c
mm
mf 1
mf 2
7
p 5
p 6
r
r
mf 7
r
r
mf 6
8

les cellules latérales et plutôt filamenteux dans les cellules axiales. De petits plastes existent fréquemment dans la zone centrale, mais rarement dans les parties latérales.

Ces faits nous permettent de conclure à l'*activité latérale d'un anneau initial typique et particulièrement bien marqué durant la phase végétative.*

Une phase de très courte durée débute alors vers le 9e à 12e jour. Elle est caractérisée par l'arrêt de l'initiation foliaire et par la présence de mitoses dans la zone axiale (*fig.* 6). Le déclenchement de cette nouvelle activité proliférative uniformément répartie estompe pour un temps la zonation végétative, et la teneur en ARN est alors élevée et presque homogène. Le nombre d'assises cellulaires augmente (quatre assises dans la figure 6). Les dimensions de l'apex, assez constantes durant la phase végétative, s'accroissent tant en largeur qu'en hauteur. Ces deux faits sont liés, la formation d'assises particulièrement régulières résultant d'une croissance anticline intense et soudaine. C'est la préfloraison.

Peu après, la phase reproductrice débute. Trois centres générateurs de méristèmes floraux apparaissent latéralement sur l'apex. Deux sont à peu près diamétralement opposés, et le troisième à une distance angulaire voisine de 90°. Chacun d'eux initie successivement un méristème floral (*fig.* 7, *mf* 1 et *mf* 2) par des mitoses périclines des 3e et 4e assises tunicales. La richesse en ARN des lieux d'initiation est grande par rapport à celle des cellules axiales qui se sont à nouveau différenciées (*fig.* 7). L'apex, entamé par l'initiation des méristèmes floraux (*fig.* 8), se régénère par des mitoses anticlines localisées dans les assises tunicales à l'aisselle de ces méristèmes. L'initiation des méristèmes floraux, suivie d'une restauration latérale de l'apex, se poursuit ainsi à un rythme accéléré jusqu'à la mort de la plante. *Il n'existe pas de période de repos relatif* contrairement au fonctionnement de l'anneau initial végétatif.

L'activité organogène et régénératrice de flanc dans l'apex reproducteur évoque donc l'existence d'une sorte *particulière* d'anneau initial.

L'évolution histologique du méristème de *Sinapis*, semblable à celle décrite par A. Lance-Nougarède ([2]) pour une autre Crucifère, apporte cependant un fait supplémentaire : l'existence d'une phase de préfloraison marquée par une dédifférenciation notable de l'apex. Le type *Sinapis* se rattache ainsi aux types plus classiques décrits par R. Buvat ([3]), A. Lance ([4]) et A. Lance et P. Rondet ([5]).

(*) Séance du 24 avril 1961.
([1]) *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 11e série, 16, 1955, p. 226-443.
([2]) *Comptes rendus*, 252, 1961, p. 924.
([3]) *Ann. Biol.*, 31, 1955, p. 596-656.
([4]) *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 11e série, 18, 1957, p. 91-421.
([5]) *Comptes rendus*, 246, 1958, p. 3177.

(*Laboratoire de Botanique de l'École Normale Supérieure et Centre de Recherches des Hormones végétales de l'I.R.S.I.A., Liège.*)

Extrait des *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*,
t. 252, p. 2750-2752, séance du 3 mai 1961.

GAUTHIER-VILLARS & C^ie^,
55, Quai des Grands-Augustins, Paris (6^e^),
Éditeur-Imprimeur-Libraire.
159597

Imprimé en France.

Extrait du *Bulletin de l'Académie royale de Belgique* (Classe des Sciences)
Séance du 7 octobre 1961

BIOLOGIE VÉGÉTALE

SUR LES PROPRIÉTÉS ANTIBIOTIQUES DU TRICHLOREX ET LA RÉALISATION DE SA SYNTHÈSE

par M. BOUILLENNE-WALRAND, J. KHALADJI
et G. WETROFF (*)

AVANT-PROPOS

Le travail que nous présentons est le résultat de plusieurs années de recherches.

Il a comme origine une étude commencée en 1948 au Centre de Recherches des Hormones Végétales à Liège, sur les propriétés biologiques et l'action physiologique des herbicides sélectifs, utilisés pour le nettoyage des terres cultivées (M. Bouillenne-Walrand, C. R.-I. R. S. I. A., 1952, n° 6). En recherchant les modalités d'action de ces herbicides sur organismes inférieurs divers, Mycètes, Levures, Bactéries, pathogènes ou non, cet auteur a décelé dans certains produits techniques l'existence d'une impureté présentant des propriétés remarquables. Cette impureté a été isolée et nommée Trichlorex.

L'identification de cette impureté a été longue et difficile en raison de son infime proportion dans les produits herbicides de synthèse dont la pureté varie considérablement avec l'origine et dont on ne connaît pas encore très bien toutes les propriétés physiques, chimiques et biologiques. Les travaux effectués au Centre de Recherches Pechiney à Aubervilliers et à Liège ont abouti à la découverte d'une formule associant un produit

(*) M. Bouillenne-Walrand, Centre de Recherches des Hormones Végétales Université de Liège et Institut Belge pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture.

J. Khaladji et G. Wétroff, Centre de Recherches de Pechiney, Aubervilliers, Paris.

Présenté par M. R. Bouillenne.

extrêmement toxique à un support inerte en un complexe remarquablement stable, distillant sans transformation sous pression réduite et dont les propriétés toxiques ou irritantes vis-à-vis des animaux et de l'homme sont considérablement atténuées, voire neutralisées mais possédant, d'autre part, un pouvoir fongicide et microbicide très étendu qui en fait un produit d'application utile en médecine humaine et vétérinaire.

Dans la première partie de ce travail, on rappelle les études qui ont mené à la découverte du Trichlorex dans le 2-4-5 trichlorophénoxyacétate sodique technique.

Dans la deuxième partie, on expose les résultats des opérations de purification du Trichlorex et les contrôles biologiques qui ont permis d'en marquer les étapes successives et de séparer le corps actif des nombreux composés inertes qui l'accompagnent dans le 2-4-5-T industriel. Un ensemble d'environ 40.000 cultures et repiquages a été indispensable pour obtenir ce résultat ainsi que pour établir le degré de toxicité du Trichlorex isolé, sur une vingtaine de microorganismes choisis parmi les plus agressifs, degré de toxicité atteignant pour certains d'entre eux un pouvoir léthal de 1 /150.000 dans les cas de purification très poussée.

Dans la troisième partie sont rapportées les techniques utilisées pour déterminer la composition et la structure du Trichlorex, pour en reconstituer la formule et en réaliser la synthèse. Il a fallu traiter environ 2 tonnes de 2-4-5-T technique pour disposer d'un échantillon suffisant de Trichlorex brut, dont l'identification, après purification par distillation et chromatographie a été réalisée en faisant appel à la spectrographie dans l'infrarouge.

Les subsides de l'IRSIA (Institut belge pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture), le dévouement du personnel de l'Institut de Botanique de l'Université de Liège et la bienveillance d'une grande firme française, PECHINEY (Compagnie de Produits Chimiques et Électrométallurgiques) qui a accepté l'importante dépense de monter une installation de demi-grand où l'on a pu traiter environ 2.000 kg de 2-4-5-T brut, ont permis de trouver la solution du problème posé. Aujourd'hui, la synthèse du Trichlorex est effectuée industriellement.

Les auteurs du présent rapport remercient non seulement les deux organismes qui leur ont permis de mener à bien cette étude, mais aussi les spécialistes qui leur ont apporté aide et conseil, principalement :

— MM. le Professeur LEDERER, Directeur de l'Institut de Biologie physico-chimique, Fondation Ed. de Rothschild, à Paris et KALLOS, Assistant.

— M. LARNAUDIE et Mme CIRENDINI, Ingénieurs au Centre de Recherches Pechiney à Aubervilliers (Seine).

— MM. les Professeurs BAUDRENGHIEN et HULS du Laboratoire de Chimie Générale de l'Université de Liège, qui ont accepté de synthétiser de nombreux dérivés phénoliques.

— M. WELSCH, Professeur de Bactériologie à l'Université de Liège.

— M. DURY, Chimiste, attaché au Centre de Recherches des Hormones Végétales de Liège et subsidié par l'IRSIA.

— M. DROMPT, Chimiste au Centre de Recherches Pechiney à Aubervilliers (Seine).

I. Les étapes de la découverte du Trichlorex.

C'est à partir d'une recherche consacrée à l'action biologique sur les plantes supérieures de certains herbicides sélectifs appartenant au groupe des substances auxiniques de synthèse que nous avons commencé l'étude parallèle du comportement de certains microorganismes : Champignons inférieurs, Levures, Bactéries (M. Bouillenne-Walrand, 1951, nos 3-4-5, 1952, no 6).

Les herbicides sélectifs sont, ou bien des substances auxiniques naturelles extraites des végétaux, ou bien des substances auxiniques de synthèse, ou encore des substances inhibitrices de croissance : anti-auxines. L'étude de leurs propriétés constitue, depuis trente ans, une importante section de la Physiologie végétale et de la Phytopharmacie. Au point de vue pratique, elle comporte entre 1953 et 1958 plus de 15.000 publications techniques et au point de vue fondamental, elle touche aux processus physiologiques de régulation ; elle a donné lieu à d'innombrables travaux dont un certain nombre sont repris dans des revues bibliographiques faites par Léopold (1955), Crafts (1956), Currier (1956) et, en 1958, par E. K. Woodford, K. Holly et C. C. Mc Cready, dans Annual Review of Plant Physiology, où les auteurs tentent une mise au point des connaissances acquises sur le mécanisme de l'action des herbicides.

Un grand nombre de composés chimiques ont été étudiés sous l'angle de leurs activités régulatrices de la croissance des végétaux supérieurs et inférieurs. Les plus couramment utilisés sont :

— l'acide β-indol-acétique, A. I. A. et ses homologues supérieurs : acides α-indol-propionique ou butyrique, A. I. P., A. I. B.

— les acides naphtalène acétique et naphtoxyacétique et leurs dérivés, esters ou sels.

— les dérivés chlorés de l'acide phénoxyacétique : mono, bi, trichlorés en diverses positions.

— Les dérivés alcoylés et chlorés de ce même acide ou de ses homologues : acides phénoxy-propionique et butyrique.

— Les dérivés chlorés de l'acide benzoïque et plus récemment les dérivés hydraziques, triazoliques, notamment les amino-triazoliques.

Il est impossible actuellement d'émettre une théorie complète sur le mécanisme cellulaire de l'action des auxines naturelles ou de synthèse : Galston et Purves remarquent encore, en 1960, que « We are still a long way from answering any fundamental questions concerning its (auxin) mode of action ».

Pourtant certaines données fondamentales ont déjà été établies.

Nous en rappellerons brièvement quelques-unes parmi celles qui intéressent le travail que nous exposons :

1) Le spectre réactionnel des substances de croissance est fonction des concentrations (proposé par R. Bouillenne, 1937, n° 11).

Les réactions biologiques à ces facteurs (ou régulateurs) de croissance peuvent être caractérisées de la manière suivante :

a) Aux doses faibles analogues aux concentrations auxiniques existant naturellement chez les végétaux (soit de 5 à 500 γ par litre, selon les plantes ou les organes étudiés), les substances auxiniques induisent l'élongation des cellules et déterminent l'allongement des organes et des tissus dont elles font partie. Elles contrôlent donc un aspect de la croissance végétale.

b) Aux concentrations plus fortes, non biologiques et non toxiques (de 5 à 500 mg ‰ environ), les substances auxiniques ralentissent l'élongation mais induisent des mitoses surnuméraires et nombreuses, notamment dans les tissus à caractère méristématique. Il en résulte qu'elles favorisent l'organogenèse puisque les cellules nouvelles formées peuvent manifester l'orientation de leur différenciation, celle-ci dépendant de leur bagage biochimique et enzymatique particulier. Elles ont donc une action morphogenétique.

c) Aux doses excessives (de 1 à 5 g ‰), les substances auxiniques sont toxiques ; d'une manière générale, elles bloquent la croissance, amènent des mouvements épinastiques des organes

ou des déformations anormales et pathologiques. Elles finissent par tuer les végétaux qui sont spécifiquement plus ou moins sensibles (c'est le principe de base de l'utilisation des herbicides sélectifs).

Elles ont donc une action léthale à des degrés variant suivant leurs concentrations et les espèces sur lesquelles elles agissent. Par conséquent, la définition du caractère auxinique (*) d'un composé naturel ou synthétique n'est pas complète si elle ne fixe pas les valeurs pondérales auxquelles il est utilisé pour obtenir l'effet attendu sur un *matériel donné*.

Le mode d'action d'un produit suivant sa concentration et suivant l'organisme ou l'organe touché, permet de réduire singulièrement les catégories établies par certains chercheurs : facteurs auxiniques, inhibiteurs spécifiques, antiauxines ; elle permet en outre de trouver quels sont les inhibiteurs *spécifiques vrais*.

Deux exemples illustrent clairement notre opinion :

L'A. I. A. est facteur auxinique pour les bourgeons aux concentrations voisines de 10^{-5} à 10^{-7} mol. Ces mêmes concentrations sont nettement inhibitrices pour les racines car, pour l'élongation de celles-ci, une concentration optimum de 10^{-9} à 10^{-11} mol. est nécessaire.

Il est faux de dire que les auxines *inhibent* l'élongation des racines (Galston, 1960). Aussi bien pour les racines que pour les bourgeons, la règle « No auxin, no growth » (Went, 1938) est vraie.

(*) La définition du caractère auxinique d'un corps a été ainsi formulée (Went, Tukey, 1954). « Auxine est un terme générique pour des composés caractérisés par leur pouvoir d'induire l'élongation des cellules de bourgeons. Ces composés ressemblent à l'A. I. A. (acide β indol-acétique) dans leur action physiologique.

» Les auxines peuvent, et en général le font, affecter d'autres processus que l'élongation, mais celle-ci est considérée comme l'action critique.

» Les auxines sont généralement des acides avec un noyau cyclique non saturé ou leurs dérivés ».

La question de savoir si les composés gibbérelliques, récemment découverts chez les végétaux supérieurs, sont ou non des auxines, est actuellement fortement débattue. En ce qui nous concerne, nous considérons les gibbérellines comme de véritables auxines car elles possèdent, sinon toutes, du moins un certain nombre, des propriétés biologiques des acides indol-acétique et homologues (M^me^ M. Bouillenne-Walrand, 1958-59, n^os^ 12, 13, 14).

On a longtemps considéré l'hydrazide maléique comme une antiauxine, un inhibiteur vrai (tel les anti-vitamines vis-à-vis des vitamines). Des expériences, réalisées au Centre de Recherches des Hormones Végétales (Liège 1958) ont montré que pour des concentrations très faibles, l'H. M. se comporte comme une substance auxinique.

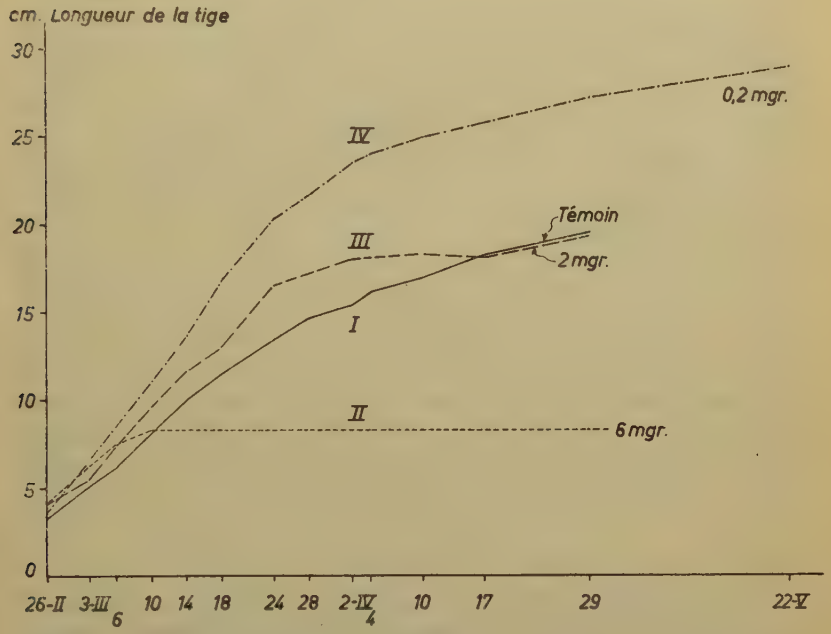


FIG. I. — *Hyoscyamus niger L.* cultivé en 16 h. de jour, T° : 20°C ; humidité : 80 %, lumière : Phytor ± 5.000 Lux.

Traité à partir du 39e jour par l'Hydrazide maléique en trois concentrations :

Série I, témoin.

Série II, solution H. M. 0,2 % trois fois 1 cc. par plante (en 20 jours) en tout 6 mgr /plante.

Série III, solution H. M. 0,02 % dix fois 1 cc. par plante (en 30 jours) en tout 2 mgr /plante.

Série IV, solution H. M. 0,002 % dix fois 1 cc. par plante (en 29 jours) en tout 0,2 mgr /plante.

Le graphique (fig. I) donne le résultat des mesures de croissance effectuées sur *Hyoscyamus niger* cultivé en serre du Phytotron de Liège et soumis à divers traitements par l'H. M. Il montre

que les plantes traitées avec l'H. M. à 0,002 % et ayant reçu chacune environ 0,2 mg de produit en 10 applications pendant un mois sont plus grandes que les témoins.

D'autres essais sur la tomate ont précisé qu'il faut utiliser une dose plus élevée d'H. M. pour obtenir avec cette plante un effet de croissance.

2) Une autre donnée importante à considérer est celle des conditions de l'environnement au moment des applications (températures, intensité et qualité de la lumière, durée de l'illumination, humidité de l'air et du sol). Ces conditions ont une influence marquée sur la pénétration et l'action des produits employés (Aslander 1950, M. Bouillenne-Walrand, 1952 ; Blackmann, 1950).

Selon Weintraub et Brown (1950), la lumière contrôlant la synthèse des glucides détermine le transport des produits de croissance (associés à celui des glucides) et influence leur action biologique. Cette action devient donc fonction indirecte des intensités lumineuses. De plus, on sait que l'application de substances de croissance amène un transport rapide des glucides et une augmentation du métabolisme oxydatif des organes traités (M. Bouillenne-Walrand, 1943, n° 2).

3) Un troisième élément fondamental intervenant dans le processus d'action des substances auxiniques utilisées comme herbicides, est la nature des sols et le *p*H de ceux-ci, de même que le *p*H des milieux de culture des microorganismes.

Ces caractéristiques jouent par exemple un rôle dans les cas où les herbicides sont appliqués dans les champs en vue d'un désherbage préventif avant semis. Des quantités de 1 à 2 kg par hectare d'herbicide sélectif suffisent pour la destruction des mauvaises herbes dans des terres acides tandis que des terres alcalines réclament 2 à 4 kg par hectare et même davantage.

Il en est de même pour le *p*H des solutions d'herbicides dans le cas où ceux-ci sont utilisés en vue d'une vaporisation sur feuilles (les poussières locales couvrant les feuilles peuvent d'ailleurs changer le *p*H des solutions). Il en est de même également

pour les solutions préparées en vue d'observer l'action des corps auxiniques dans la croissance des végétaux inférieurs.

Nous pensons que cette action du *p*H est due au fait que l'état de dissociation des molécules correspondant aux divers niveaux de *p*H, détermine le degré de pénétration de celles-ci dans les cellules et, partant, leur activité.

Déjà, en 1930, R. Bouillenne avait montré que dans la série de l'acide acétique et de ses homologues supérieurs (propionique, butyrique, etc...), ce sont, pour une concentration moléculaire équivalente, les moins dissociés qui pénètrent le plus rapidement.

Les travaux réalisés à Liège de 1947 à 1952 (R. Bouillenne et M. Bouillenne-Walrand) ont mis l'accent sur le degré d'activité des facteurs de croissance, fonction inverse du degré de dissociation ; les herbicides sélectifs et les substances de croissance étant généralement des acides faibles (ou leurs sels, esters ou amines), c'est aux *p*H acides que leur dissociation est minimum et qu'elle correspond à la plus grande réactivité.

Il en résulte que nous attribuons, pour une grande part, la variabilité de l'action des herbicides à leur degré de pénétration dans les cellules. Certains auteurs, comme Van Overbeek (1951) ont aussi proposé que seule la forme non dissociée des auxines et des facteurs de croissance est physiologiquement active, parce qu'elle est celle qui pénètre réellement.

Cependant, Orgell et Weintraub (1956), Blackman (1956), Wedding et Erickson (1957) ont indiqué que, dans certaines conditions, le 2-4 D peut être absorbé aussi bien pour des *p*H neutres qu'acides, mais ces résultats sont à notre avis, peu concluants. Par contre, les très beaux travaux de Bennet (1955) sur divers corps auxiniques vérifient que ces corps entrent à l'état non dissocié. Bennet a utilisé comme matériel expérimental *Nitella* qu'il place dans des solutions de diverses concentrations et de divers *p*H. Il examine à quel moment (T_1) le courant cytoplasmique cesse. Il constate que T_1 dépend uniquement de la concentration des molécules non dissociées de la substance auxinique dans le voisinage de la surface de la membrane.

Depuis 1952, nous avons confirmé sur diverses espèces de végétaux supérieurs et sur de nombreux organismes inférieurs notre proposition qui, croyons-nous, est d'application générale ;

les *herbicides auxiniques :* acide β indol-acétique (A. I. A.) et ses homologues supérieurs A. I. P., A. I. B., les dérivés mono-bi-tri chlorés de l'acide phénoxyacétique (M. C. P. A., 2-4 D, 2-4-5 T) sont beaucoup plus actifs si les solutions d'application sont amenées aux *p*H acides, plutôt qu'aux *p*H neutre ou alcalin.

Bien entendu, l'augmentation des concentrations des solutions alcalines permet d'obtenir des effets physiologiques analogues à ceux qu'on obtient par des solutions acides moins concentrées.

Recherches micro-biologiques.

Ces préliminaires sur les conditions d'action des herbicides sélectifs ayant été rappelés brièvement, nous aborderons les exposés des travaux qui ont abouti à la découverte du Trichlorex.

On a été amené tout naturellement à rechercher l'action que pourraient avoir les herbicides sélectifs utilisés sur les plantes supérieures, lorsqu'ils entrent en contact avec la microflore du sol.

On sait quelle importance la composition de cette microflore présente dans la question du rendement des cultures, de la fertilité, et en somme, dans le déroulement des réactions microbiologiques nécessaires aux équilibres sol-végétation.

Si cette microflore comporte des organismes indifférents à la vie des racines, elle en contient beaucoup d'autres qui sont utiles ou nuisibles. Toute modification, non seulement dans la nature des groupements des microorganismes du sol mais aussi dans leur valeur quantitative, retentit gravement sur les mécanismes naturels de la fertilité.

Cette microflore est variée et abondante ; elle représente un constituant organique dont on peut chiffrer l'importance : par hectare et sur une épaisseur de 30 cm de sol, il correspond à 15-16 tonnes en région tempérée. Aussi a-t-on recherché si :

— les concentrations actives des herbicides sur les végétaux supérieurs le sont également sur les inférieurs.

— une spécificité des divers herbicides auxiniques existe vis-à-vis d'un organisme déterminé.

— le rôle du *p*H du sol ou des solutions actives est comparable à ce qui se passe pour les végétaux supérieurs.

La littérature constate que d'une manière générale, les micro-organismes sont plus résistants aux herbicides auxiniques que les plantes supérieures (Woodford et all., 1958). Cependant, on a relevé (Quastel et Scholefield, 1953) que la nitrification des sols peut être gravement altérée par certains produits appliqués en concentrations utiles pour leur fonction d'herbicides (comme le dérivé uréique de l'acide mono-chlorophénoxyacétique).

Spécificité de l'action léthale

On a montré (M. Bouillenne-Walrand, 1951, nº 3) que des organismes comme *Fusarium vasinfectum* Atk, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Pseudomonas aeruginosa*, cultivés en boîtes de Petri sur milieux nutritifs appropriés, contenant des produits auxiniques, subissent des arrêts ou des ralentissements de croissance. Des documents ont été ainsi apportés qui prouvent que ces organismes présentent des réactions de spécificité au moins aussi nettes que celles des végétaux supérieurs.

Par exemple : *Fusarium vasinfectum* Atk manifeste une indifférence remarquable vis-à-vis d'un herbicide puissant comme le 2-4 D, mais il est fortement inhibé par l'acide indol-propionique (A.I.P.) et l'acide indol-butyrique (A. I. B.) tandis qu'aux mêmes concentrations, il n'est guère influencé par l'A. I. A.

C'est évidemment au remplacement du radical acétique par le radical propionique ou butyrique qu'est due l'inhibition de *Fusarium*. Cet organisme est vraisemblablement incapable d'effectuer la scission des chaînes latérales propioniques ou butyriques.

La sensibilité particulière de certains « Imperfecti » aux acides β indol-propionique et butyrique a été également vérifiée sur un autre champignon inférieur isolé de bouleaux morts et identifié *Truncatella ramulosa*. Cultivé sur Richard gélosé ordinaire, il se développe avec une vigueur remarquable ; en une dizaine de jours, la gélose des boîtes de Petri est recouverte par le mycelium. Avec ce milieu, on réalise les séries suivantes :

1) milieu de Richard ..... pH 4,5
2) » + 0,315 g % de $Na_2 H PO_4 12H_2O$ .. pH 5,5

Les séries 3 à 9 contiennent le milieu (2) additionné des concentrations 0,006 mol (*) des corps suivants :

3)	acide β indol-acétique (1,28 g)	pH 5,5
4)	» propionique (1,38 g)	
5)	» butyrique (1,48 g)	
6)	2-4-D Na pur (1,66 g)	
7)	2-5 D Na pur (1,66 g)	
8)	2-4-5 T Na technique (1,92 g)	
9)	Méthoxon (1,47 g) (2 méthyl 4 chloro phénoxyacétique)	
10)	4 chlorophénoxyacétate de Na (1,42 g)	

Ces milieux, maintenus au pH 5,5 au moyen de phosphates, sont stérilisés à l'autoclave (110° C pendant 20 minutes) coulés en boîtes de Petri, refroidis et inoculés à raison de 3 boîtes par série avec la même quantité de mycelium. Les cultures sont mises en étuve à 20° C. Après 14 jours de culture, les boîtes sont examinées et l'on constate que certains produits sont nettement inhibiteurs de la croissance :

Séries 1 et 2) témoins	croissance exubérante
3) A. I. A.	» bonne
4) A. I. P.	» nulle
5) A. I. B.	» »
6) 2-4 D	» bonne
7) 2-5 D	» »
8) 2-4-5 T technique	» nulle
9) Méthoxon	» assez bonne
10) 4 chlorophénoxyacétique	» nulle

Pour ce dernier corps, la pureté n'était pas garantie.

La figure II reproduit l'aspect des 4 premières séries expérimentales :

1 et 2 témoins au pH 4,5 et 5,5
3 et 4 contenant (à g.) A. I. A. et (à dr.) A. I. P.

(*) Des expériences préliminaires nous ont montré que la concentration 0,006 mol est la plus adéquate pour départager les influences ioniques.

Ph. : R. Sauveur (29-6-1951).

Fig. II. — Culture de *Truncatella ramulosa* (v. Beyma) Steyart, isolé d'un Bouleau mort.

Milieu de culture : Richard gélosé à 2 %.

La photo représente des boîtes de Pétri contenant :

1re rangée horizontale, milieu témoin : à gauche : *p*H 4.5,
à droite : *p*H 5.5,

2me rangée horizontale, milieu contenant : à gauche : AIA.,
à droite : AIP.

Les auxines sont ajoutées en concentration 0.006 mol.

Les deux cultures sont au *p*H 5.5.

L'implantat de *Truncatella ramulosa* mort se distingue au milieu de la boîte de Pétri contenant AIP (no 4).

Le résultat est très comparable à celui que donne *Fusarium vasinfectum ;* indifférence vis-à-vis de A. I. A., sensibilité considérable vis-à-vis de A. I. P. et A. I. B., indifférence vis-à-vis des herbicides *purs* de la classe des 2-4 D.

De même *Staphylococcus aureus* est, au *p*H 5.5, indifférent à A. I. A. et totalement inhibé par A. I. P. à concentrations équimoléculaires (0,006 mol). Par contre, *Pseudomonas aeruginosa* et *Sarcina lutea* sont inhibés surtout par l'A. I. A. et restent, en général, peu sensibles aux autres hormones d'application y compris l'A. I. P.

D'une manière générale, nous avons constaté que les dérivés indol-propioniques ou indol-butyriques sont plus actifs que les phénoxy-acétiques sur les organismes inférieurs ; chez les végétaux supérieurs, c'est l'inverse qui se produit.

D'aucuns (Walker et Newman, 1956) expliquent la moins grande activité des dérivés chlorés phénoxyacétiques sur la microflore par le fait que certains organismes (pas tous) sont capables de décomposer en tout ou en partie les molécules d'herbicides et de les rendre ainsi moins actives.

Role du *p*H dans le milieu

L'influence du *p*H du milieu sur l'activité des herbicides vis-à-vis des microorganismes a déjà été signalée (M. Bouillenne-Walrand 1951, nº 4). Elle est basée sur des expériences antérieures de physiologie établissant le rôle de la réaction du milieu sur la perméabilité cellulaire et la pénétration ou l'arrêt de pénétration d'une substance déterminée (R. Bouillenne 1930).

Cette même considération est d'ailleurs valable aussi pour les bases. Weissman (1950) a montré que l'ammonium est absorbé principalement comme molécule d'ammonium hydroxyde et que, par conséquent, la pénétration de celui-ci dépend de l'augmentation du *p*H de la solution (Exp. sur plantules de Blé).

Sur ce sujet, peu de recherches systématiques ont été réalisées. Nous citerons les travaux remarquables de Blackman sur la croissance d'organismes comme *Trichoderma viride,* cultivés en

présence d'herbicides sélectifs et à divers *p*H : la différence dans l'intensité d'action d'une même concentration de produit peut varier de 1 à 1.000 en fonction du *p*H ; et les résultats de Wei et Ling (1948) sur la germination de spores de *Gloeosporium colletrichum* en présence d'un milieu contenant du 2-4 D sont probants. A la concentration de 1 ppm en *p*H 3,9, toute germination est empêchée ; aux *p*H supérieurs, l'action est moins radicale.

De même Naito N. et Tani T. (1953) ont montré que l'acidité du milieu (*p*H 5.5) favorise l'activité du 2-4 D. appliqué à *Gloeosporium olivarum*. Au-dessus du *p*H 5.5, cette activité est fortement diminuée ; cependant les témoins croissent fort bien entre *p*H 4 et 8. Travaillant sur le même organisme, Wei et Ling ont trouvé que le 2-4 D., en faible concentration, raccourcit le temps de germination des spores, mais n'en augmente pas le pourcentage.

Ces observations sont en accord complet avec celles que nous avons enregistrées (M. Bouillenne-Walrand, 1951) en cultivant des organismes appartenant soit à la microflore du sol, soit aux groupes des agents pathogènes de l'homme et des animaux.

Lorsque la croissance d'un organisme est inhibée aux *p*H acides (3,9 ; 4 ; 5,5) par un herbicide auxinique employé à une concentration d'environ 0,006 mol, elle ne l'est pas en général à la *même concentration*, à des *p*H plus élevés (*p*H 6 à 7).

La conclusion de tous nos essais sur la microflore a été que, pour une même concentration moléculaire (0,006 mol) de produits actifs, le degré d'action fongistatique ou fongicide est comme pour les végétaux supérieurs, liée à la nature des espèces et *fonction inverse* du *p*H de la solution.

Cette dernière fonction est valable à condition que l'on utilise des produits chimiquement purs.

Les résultats contradictoires apportés par la littérature sur l'influence du *p*H doivent être attribués au fait que l'on utilise parfois des produits dont la pureté n'a pas été vérifiée. Dans les lignes qui suivent, nous allons justifier cet avis.

Produits purs et produits techniques.

Les expériences réalisées sur la croissance de microorganismes divers et de champignons inférieurs, au moyen d'herbicides auxiniques à l'état pur, nous ont donné des résultats homogènes et constants, mais en 1951, travaillant avec des 2-4-5 T (acide ou sel sodique) de qualité technique, nous avons constaté que ceux-ci ne répondaient pas à la règle de *p*H que nous avons précisée. De plus ils se montraient beaucoup plus actifs. Ces 2-4-5 T techniques étaient, selon les fabricants, des mélanges de 2-3, 2-4, 2-5 et 2-4-5 T.

Une telle irrégularité, par ailleurs intéressante, pouvait être provoquée soit par une synergie, soit par des impuretés.

Recherche d'une synergie dans des mélanges d'herbicides analogues à ceux existant dans les 2-4-5 T *techniques.*

Le problème d'une synergie éventuelle entre les différents constituants devait donc être examiné. Cette action de synergie est en effet, fréquente dans les réactifs biologiques ; elle peut augmenter l'action de deux produits associés beaucoup plus qu'en valeur simplement additive.

Il est opportun de rappeler, à ce sujet, une expérience (R. Bouillenne et M. Bouillenne Walrand, 1952) dans laquelle des organismes ont été cultivés en milieux nutritifs (soit de Sabouraud, soit de Richard) ajustés à 3 valeurs de *p*H différentes : 4,5 ; 5,5 ; 6,9. On a ajouté à chacun de ces milieux, en concentration 0,006 mol. les produits suivants :

1) A. I. A.
2) A. I. P.
3) un mélange A. I. A. + A. I. P.
4) 2-4 D.
5) 2-3 D
6) 2-5 D
7) un mélange des 3 derniers en quantité telle que la concentration finale 0,006 mol. soit respectée,

8) 2-4-5 T acide pur,
9) 2-4-5 T sel sodique pur,
10, 11, 12) trois 2-4-5 T de qualité technique d'origines différentes : anglaise, française, belge,
13) 2-4-6 T acide pur,
14) un mélange 2-4-5 T + 2-4-6 T purs.

L'ordre des manipulations a été le suivant : constitution des milieux de culture (Sabouraud ou Richard) ; addition des produits ; ajustement des *p*H ; stérilisation, coulée en boîtes Petri et après refroidissement, repiquage en chambre stérile puis incubation en étuve biologique à 30°.

Sur ces différents milieux amenés aux *p*H 4,5, 5,5, 6,9 ont été repiqués les organismes suivants :

Trichophyton schoenleini, Tr. crateriforme, Tr. violaceum Sab., Tr. *acuminatum Sab., Tr. gypseum granulosum, Tr. gypseum asteroïdes*, Tr. *rubrum* (A. Cast) Sab., *Tr. interdigitale* (Priestley), *Epidermophyton floccosum* (Harz) Lange et Milochevitch (syn. inguinale Sab.), *Sporotrichum Schenkii* Hektoen et Perkins, *Scopulariopsis brevicaulis* Guill, *Cephalosporium* sp., *Microsporum felineum* Fox et Blaxal, *Microsporum audouini* Gruby *Mic. duboisii* Vanbreuseghem, *Mic. quinckeanum* Zopf, *Nocardia asteroides, Noc. africana (?) Candida albicans, Cryptococcus neoformans.* (Sanfelici) Vuillemin.

Les réponses des organismes aux différents milieux se sont présentées de manière nette après 10 jours de culture (sauf pour *Nocardia* dont la croissance est très lente et qui exige, avant de pouvoir être examiné, un mois de culture).

Dans le cas des produits purs, le pouvoir inhibiteur total ou partiel des différents corps décroît avec l'augmentation du *p*H du milieu. En effet, d'une manière générale, au *p*H 4-5 tous les organismes sont *inhibés totalement* par tous les produits sauf A. I. A., celui-ci n'empêche la croissance que de 7 organismes : *Trichophyton interdigitale, Epidermophyton inguinale, Scopulariopsis brevicaulis, Microsporum felincum, Microsporum andouinii* et deux *Nocardia*, tous les autres organismes manifestent à ce *p*H et en présence d'A. I. A. une croissance plus ou moins abondante.

Trois résultats de cette expérience sont remarquables :

1) *Candida albicans* et *Streptococcus neoformans* résistent à tous les produits purs quel que soit le *p*H de 4-5 à 7.

2) *Aucune synergie* n'est à déceler en ce qui concerne les mélanges de produits purs.

3) Tous les organismes sans exception sont inhibés totalement et quel que soit le *p*H par deux 2-4-5 T techniques (origine française et belge).

Par conséquent, puisque la synergie entre produits purs est exclue, l'hypothèse s'impose que certains 2-4-5 T techniques contiennent un ou des corps particulièrement actifs, peu ionisables puisque le *p*H n'a pas d'influence.

Recherche d'une impureté dans certains 2-4-5 T. techniques.

Une expérience (R. Bouillenne et M. Bouillenne-Walrand) a permis de contrôler et de vérifier cette hypothèse. En voici brièvement les éléments.

Un des 2-4-5 T. acides techniques a été traité de manière à en isoler une probable impureté : neutralisé à peu près totalement par NaOH, séché à l'étuve, réduit en poudre, traité par l'éther éthylique désoxydé et sec sous agitation continue. L'extrait de consistance huileuse récolté a été incorporé à du milieu de Sabouraud comparativement avec d'autres produits.

Les séries suivantes ont été préparées :

1) Sabouraud seul.

2) L'impureté isolée du 2-4-5 T.

3) Le 2-4-5 T. technique intact.

4) Le même 2-4-5 T technique purifié à l'éther.

5) Le 2-4-5 T purifié + l'impureté réajoutée dans les mêmes proportions que celles existant dans le produit technique.

6) Un 2-4-5 T. pur (chimiquement).

7) Le même 2-4-5 T. + l'impureté.

Chaque série expérimentale a été réalisée à 2 *p*H : 4,9 et 6,9.

Les souches de *Trichophyton interdigitale, Tr. gypseum granulosum, Candida albicans, Nocardia africana, Scopulariopsis brevicaulis* ont été expérimentées.

Le résultat est concluant ; c'est bien l'impureté extraite par l'éther qui confère au 2-4-5 T. technique son activité extraordinaire, car elle empêche la croissance de *tous* les organismes, même au *p*H 6,9.

Les tableaux indiquant le détail des résultats obtenus ont été publiés (Bouillenne-Walrand 1952, nos 7 et 8) ; nous présenterons ici deux figures particulièrement démonstratives :

La figure III représente des cultures de *Trichophyton interdigitale* sur milieux de Sabouraud amenés au *p*H uniforme de 6,9.

En I. — Milieu témoin au *p*H 6,9 : la croissance du champignon est abondante.

Après dix jours, à température de 30° C, la boîte de Petri est remplie de mycelium blanc caractéristique (à g.).

Après le même temps sur le même milieu additionné de l'impureté extraite d'un 2-4-5 T technique à la concentration de 0,13 ‰, il n'y a aucune croissance ; les 3 implantats ne se sont pas attachés sur la gélose et sont morts (à dr.).

En II. — Milieu contenant le 2-4-5 T technique, au *p*H 6,9, concentration 0,006 Mol.

Les implantats sont morts (à g.).

Même milieu contenant la même dose du même 2-4-5 T technique, au même *p*H, mais soigneusement purifié à l'éther : la croissance du champignon est très abondante mais un peu moins bonne que dans le témoin (au milieu).

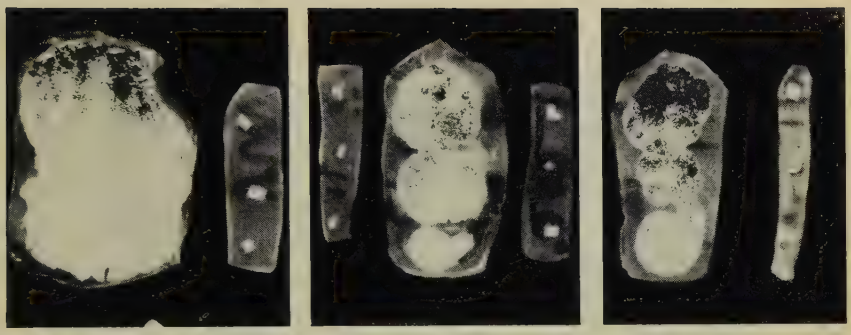
Milieu contenant et le 2-4-5 T purifié et l'impureté extraite par l'éther puis réajoutée :

La croissance est nulle (à dr.).

En III. — Milieu contenant un 2-4-5 T chimiquement pur, même concentration, même *p*H :

La croissance du mycelium est abondante (à g.).

I II III



Expérience du 13-3-1952.

Ph. : R. Sauveur.

Fig. III. — *Trichophyton interdigitale* (Priestley).

Aspect des cultures de *Trichophyton interdigitale* sur les divers milieux. On a découpé dans la gélose des cultures en boîte Pétri les bandes portant les implantats. Ceux-ci restent bien visibles sauf dans le témoin où ils se sont rejoints. Partout où l'impureté existe, la croissance est nulle.

I. Sabouraud seul (à g.) :
Idem + impureté, 0.1355 pour 1000 (à dr.).

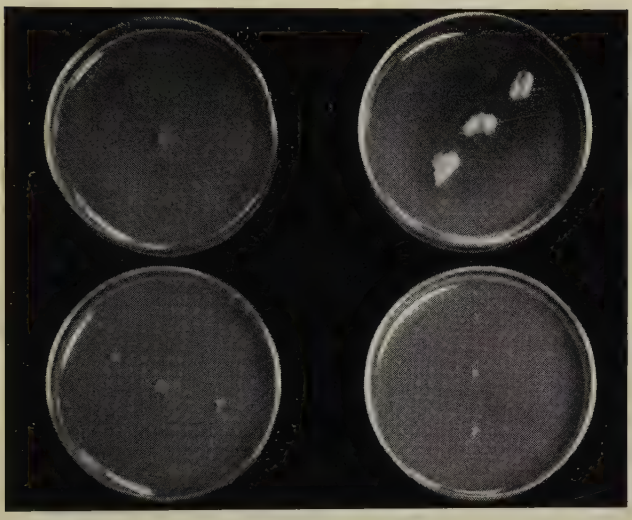
II. Sabouraud contenant un 2-4-5 T Na technique à la concentration de 0.006 Mol. (à g.) ;
Le même 2-4-5 T Na mais purifié par nous (au centre) ;
Le 2-4-5 T Na purifié + impureté réajoutée en même concentration que dans le produit brut (à dr.).

III. Sabouraud contenant un 2-4-5 T acide chimiquement pur — *p*H 6.9 (à g.) ;
Idem + impureté 0.1355 pour 1000 (à dr.).

Expérience du 13 mars 1952.

Témoin : Sabouraud + 2-4-5 T Na pur (0.006 mol.).
Idem + impureté 17 mgr 75 %.

*p*H 4.9 *p*H 6.9



Ph. : R. Sauveur.

Fig. IV. — *Trichophyton schöenleini* (Lebert) Langeron et Milochesitch (origine Baarn).

Cultivé sur Sabouraud additionné de 2-4-5 T Na, pur 0.006 Mol.

1re rangée horizontale : 2-4-5 T Na seul.

2me rangée horizontale : 2-4-5 T Na + impureté (17 myr 75 %).

Chaque boîte de Pétri reçoit trois implantats.

Milieu contenant le même 2-4-5 T pur, additionné de l'impureté extraite du produit technique précédent :

La croissance est nulle (à dr.).

La photo de la figure IV est également très démonstrative ; elle concerne *Trichophyton schoënleini* cultivé sur milieu de Sabouraud contenant du 2-4-5 T pur en concentration 0,006 mol à deux *p*H différents : 4,9 et 6,9. (Rangée horizontale, haut) :

Dans le milieu au *p*H 4,9, le champignon ne croît pas ;

Dans celui au *p*H 6,9 il croît à peu près normalement.

Si on ajoute l'impureté en même concentration dans les deux séries expérimentales, on ne constate aucune croissance, quels que soient les *p*H ; c'est-à-dire que l'impureté masque totalement l'action différentielle du 2-4-5 T aux deux *p*H. (Rangée du bas).

Conclusions.

Le comportement particulier de certains 2 4 5 T techniques vis-à-vis des microorganismes, est dû à une impureté de consistance huileuse contenue dans ces produits et non à une synergie entre les composés chlorés de l'acide phénoxyacétique. Cette impureté agit sur tous les organismes expérimentés en culture in vitro : elle empêche leur croissance à la concentration qu'elle présente dans les 2-4-5 T techniques ; son action est indépendante du *p*H du milieu ; elle doit donc avoir une formule moléculaire différente de celle des acides phénoxyacétiques [1].

(à suivre)

---

[1] A peu près en même temps que nos premières publications, a paru (Berit Hansen, 1951) une étude de l'action des impuretés d'un Methoxone technique sur la croissance et la morphologie de plantes supérieures.

BIBLIOGRAPHIE

Aslander, A., Some factors influencing the effect of 2-4 D in perennial weeds and crop plants. *Svensk. Bot. Tidskr.* **44**, 97, 1950.

Bennet, M. C., The influence of the cell membrane on some toxicity effects of growth substances in *Nitella*. *Jl. Exp. Bot.* 6, 17, 276-287, 1955.

Blackman, G. E. et Robertson-Cuningham, R. C., Interrelationships between light intensity, temperature and the physiological effects of 2-4 Dichloro-phenoxyacetic acid on the growth of *Lemna minor*. *Jl. of Exp. Bot.* 6, 17, 156-177, 1950.

Blackman, G. E., The chemistry and mode of action of plant growth substances. 312 pp., 1956.

Bouillenne-Walrand, M., Action de l'hétéroauxine appliquée aux grains de *Zea Maïs* sur le rendement en épis. *Bull. Soc. Roy. Sciences*, Liège, nº 3, 1943.

—, Action de l'hétéroauxine sur la respiration des plantules de *Zea Maïs*. *Bull. Soc. Roy. Sciences*, Liège, nº 3, 1943.

—, De l'influence des hormones végétales de synthèse sur la croissance de *Fusarium vasinfectum*. *Bull. Acad. Roy. Belg. Cl. des Sciences*, 5e série, XXXVII, 7, 1951.

—, Influence du pH sur l'action inhibitrice des hormones végétales de synthèse dans la croissance des *Trichophyton* (div. sp.). *Bull. Soc. Roy. Sc.*, Liège, nº 11, 1951.

—, Action de certaines phytohormones d'application sur la croissance des champignons inférieurs : *Trichophyton* div. sp., *Staphilococcus aureus, Sarcina lutea, Pseudomonas aeruginosa*. *Bull. Acad. Roy. Belg. Cl. Sc.*, 5e série, XXXVII, p. 567, 1951.

—, Travaux du Centre de Recherches des Hormones Végétales. *I.R.S.I.A. C. R. Recherches de l'I.R.S.I.A.* (1949-1950), 1952.

—, Influence des impuretés contenues dans les hormones de synthèse (qualité technique) sur la croissance d'organismes végétaux inférieurs. *Bull. Cl. Sciences, Acad. Roy. Belg.* 5e série, XXXVIII, 1952.

—, Sur l'importance, pour l'agriculture, de la pureté des hormones de synthèse et herbicides sélectifs. *Bull. Soc. Roy. Sciences*, Liège, 11, 1952.

Bouillenne, R., Contribution à l'étude des phénomènes d'osmose dans les cellules végétales. Un appareil nouveau pour la mesure des vitesses de pénétration des solutions salines dans le protoplasme végétal. *Bull. Ac. Roy. Belg.* XVI, 8, 1930.

—, Études sur la perméabilité des cellules de *Tradescantia virginica* et *Allium cepa*. *Bull. Ac. Roy. Belg.* XVI, nº 8, 1930.

—, L'action des phytohormones sur la croissance, la division des cellules et l'organogenèse. *Bull. Soc. Roy. Sc. Liège*, nº 11, 1937.

Bouillenne-Walrand, M., Les gibbérellines, facteurs auxiniques chez les plantes supérieures. *Bull. Soc. Roy. Sc. Liège*, 9-10, 1958.

—, Les gibbérellines, facteurs de croissance chez les végétaux supérieurs. *Bull. Soc. Roy. Sciences*, Liège, 1-2, 1959.

—, Action des gibbérellines sur la croissance et la floraison des végétaux supérieurs ; relations avec l'acide β indol-acétique. Symposium de Phytopharmacie de Gand, 1959.

Craft, A. S., Herbicides. *Ann. Review of Plant Physiology*, 4, 253-283, 1953.

Currier, H. B., Effects of toxic compounds : stimulation, inhibition, injury and death. *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, 2, 792-825, 1956.

Galston et Purves, Mechanism of auxin action. *Ann. Rev. of Plant Physiol.*, 11, 239-267, 1960.

Gruen H. E., Auxins and Fungi. *Ann. Rev. of Plant Physiol.*, 10, 405-440, 1959.

Hansen Berit, Impurities in technical Methoxone and their influence on plants. *Physiol. Plantarum*, 4, 667-676, 1951.

Léopold, A. C., Auxins and plant growth. University of California Press, 354 pp., 1955.

Naito, N. et Tani, T., In Kagawa Kenritsu Noka Daigaku. *Gakujutsu* Hokoku, 5, 1953, aussi dans : Gruen, A. E., *Ann. Rev. of Plant Physiol.*, 10, 405-440, 1959.

Ogle, R. E. et Warren G. F., *in Weeds*, 3, 257-273, 1954.

Orgell, W. H. et Weintraub, R. L., *in Plant Physiol.* (Suppl.), 31, 21, 1956.

Quastel, J. H. et Scholefield, P. G., *Appl. Microbiology*, 1, 282-87, 1953.

Rimbaud, M. P., Les Candidoses. *Bull. Soc. Fr. de Dermatologie et de Syphiligraphie*, 67, 1960.

Ripper, W. E., *in Proc. Britisch Weed Control Conf.* 3nd. Meeting Blackpool, 225-232, 1956.

Walker, R. L. et Newman A. G., *in Appli. Microbiology*, 4, 201-6, 1956.

Van Overbeek, Blondeau et Horne, Trans-cinnamic acid as an anti-auxin. *Am. Jl. Bot.* 38(8), 589-96, 1951.

Wedding, R. T. et Erickson, L. C., *in Plant Physiol.* (Suppl.), 32, 42, 1957.

Wei, C. T. et Ling, K. C., in *Bull. Acad. Sinica*, 2, 275-81, 1948.

Weintraub, R. L. et Brown, J. W., Translocation of exogenous growth regulators in the Bean seedlings. *Plant Physiol.* 25, 140, 1950.

Weissman, G. S., Growth and Nitrogen Absorption of Wheat Seedlings as influenced by the Ammonium Nitrate and the Hydrogen-Ion Concentration. *Am. Jour. Bot.* 37, 725-38, 1950.

Went, F. et Tukey, *in Plant Physiology*, 29, 307, 1954.

Woodford, E. K., Holly, K. et Mc Cready, C. C., Herbicides. *Ann. Rev. of Plant Physiol.*, 9, 311-358, 1958.

Extrait du *Bulletin de l'Académie royale de Belgique* (Classe des Sciences)
Séance du 7 octobre 1961

BIOLOGIE VÉGÉTALE

SUR LES PROPRIÉTÉS ANTIBIOTIQUES DU TRICHLOREX ET LA RÉALISATION DE SA SYNTHÈSE

II. Extraction du Trichlorex — Essais de purification — Mesures de toxicité sur végétaux inférieurs des produits isolés,

par M. BOUILLENNE-WALRAND, J. KHALADJI
et G. WETROFF (*)

Dans une précédente communication (**), il a été montré qu'une impureté est contenue dans des hormones de synthèse, en l'occurrence certains 2-4-5 trichlorophénoxyacétates sodiques ; même en concentrations très faibles (de l'ordre de 1 ‰) elle peut intervenir dans leur mode d'activité biologique et conduire à des conclusions erronées :

1) Elle peut en effet masquer l'action réelle du produit vis-à-vis des organismes réagissant. Par exemple, *Candida albicans* est totalement indifférent à une concentration de 0,006 Mol de 2-4-5 T. *pur* dans son milieu de culture, quel que soit le pH de 4-5 à 7, alors qu'il est inhibé par la même concentration d'un 2-4-5 T. *technique* dans les mêmes conditions ioniques.

2) Elle peut aussi faire perdre de vue l'importance du pH dans le milieu qui contient l'hormone de synthèse :

au pH 4. 5. un grand nombre d'organismes sont inhibés par le 2-4-5 T. *pur*, en concentration 0,006 Mol,

(*) M. Bouillenne-Walrand, Centre de Recherches des Hormones végétales Université de Liège et Institut pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (I. R. S. I. A.).
J. Khaladji et G. Wétroff, Centre de Recherches de Péchiney, Auber-villiers, Paris.
(**) Bul. Ac. Roy. Belg. Sc., 1961.

au pH 6. 5 à *7*, ils ne sont pas inhibés : le produit ne pénètre pas dans leurs cellules comme il a été dit précédemment.

Si le 2-4-5 T. contient l'impureté, les organismes considérés sont totalement inhibés quel que soit le pH du milieu, ce qui pourrait amener l'idée que ce résultat est dû au 2-4-5 T. lui-même.

Extraite par l'éther sulfurique et après évaporation progressive du solvant (Bouillenne-Walrand 1952 nº 7-8) (1) l'impureté se présente comme une huile plus ou poins colorée. Conservée en exsiccateur et en glacière, elle laisse déposer progressivement des cristaux d'activité biologique très réduite et qui sont des compagnons de l'huile active. Nous avons nommé cette huile *Trichlorex*. Celle-ci a une grande stabilité et se manipule très facilement ; sa tension de vapeur est relativement faible ; après plusieurs mois, elle garde toute son activité sur les microorganismes.

Nous avons supposé que le Trichlorex pouvait contenir des dérivés des trichlorophénols utilisés pour la synthèse des 2-4-5 T. (M. Bouillenne-Walrand, 1952). Cependant, le Trichlorex brut qui est une huile, ne présente pas les caractéristiques physiques des trichlorophénols ni des autres dérivés chlorés des phénols qui sont solides à la température ordinaire. De plus, les phénols chlorés sont extrêmement irritants et difficiles à manipuler à cause de leur haute tension de vapeur à température ordinaire, ce qui exclut, d'ailleurs, leur utilisation en médecine malgré leur puissante action désinfectante.

Le problème posé est donc d'isoler les différents constituants de l'huile brute, d'en établir les activités biologiques et d'en rechercher les formules de structure.

Outre la méthode de séparation par solubilités différentielles dans deux solvants, éther éthylique et éther de pétrole, on a utilisé deux procédés de séparation : la chromatographie et la distillation (sublimation) sous vide poussé et à faible température.

Il nous a paru intéressant de rechercher, dans un essai préliminaire, si plusieurs 2-4-5 T., d'origine différentes, présentaient des proportions variables de cette impureté particulièrement active.

(1) Ces références bibliographiques figurent dans la première note.

Nous avons ainsi utilisé sept 2-4-5 T. (1) purs ou techniques. Ils ont tous été traités de la manière suivante :

1) Neutralisation approximative par NaOH et dessication à température modérée (— de 60°) ; pulvérisation de la masse.

2) Extraction par éther éthylique (désoxydé et sec) dans des ballons en verre placés sur une agitatrice. L'extraction dure 24 heures.

3) Concentration (à 1 /10 du volume) de l'extrait obtenu, ceci amenant généralement le dépôt des cristaux blancs peu actifs de 2-4-5 T.

4) Traitement de la solution éthérée, brune, huileuse obtenue (après élimination de la plus grande partie des cristaux blancs) par l'éther de pétrole léger (point d'ébullition : 35-40°).

5) Filtration, élimination du précipité blanc, en aiguilles cristallines, qui peut se former pendant l'opération ; mise en glacière pendant un temps variable.

6) Évaporation lente de la solution éther de pétrole et filtration des cristaux blancs qui peuvent encore apparaître dans l'extrait huileux ; enfin évaporation totale du solvant.

7) Essais biologiques des extraits obtenus.

Les 2-4-5 T. purs ne contiennent pas de produits huileux. Comme nous l'avons déjà dit, en concentration 0,006 Mol et au pH 7, ils ne sont pas inhibiteurs de la croissance des organismes utilisés : 3 espèces de *Trichophyton*, 2 espèces de *Candida*, une série de microbes banaux ou pathogènes.

Deux 2-4-5 T. techniques (belge et français) contiennent le produit huileux en proportions variables ; un troisième 2-4-5 T. technique d'origine française contient des impuretés mais d'un type très différent et d'activité fongicide réduite. Il en est de même pour les autres 2-4-5 T. expérimentés.

La suite de nos recherches a été effectuée sur un seul 2-4-5 T. sodique (ou acide) de qualité technique d'origine française.

(1) Origines : anglaise, américaine, française, allemande et belge.

Nous avons successivement traité des lots de 200 g, 250 g, 2,400 kg, de 2,500 kg, et trois lots de 10 kg de 2-4-5 T. Na.

Les différentes étapes de l'extraction et de la purification ont été contrôlées par des essais d'activité biologique, utilisant principalement deux organismes pathogènes : *Trichophyton interdigitale* et *Candida albicans*, ce dernier étant, nous l'avons vu, beaucoup plus résistant que *Trichophyton*.

La technique suivie sera la même pour tous les essais biologiques réalisés avec le Trichlorex : le milieu de Sabouraud, préparé, est amené aux pH 4.9 ou 5.9 ou 6.9 au moyen des phosphates mono et di-sodiques ; on y incorpore le produit étudié en concentrations connues. Il a été vérifié que le Trichlorex ne change pas le pH du milieu auquel il est incorporé.

Les milieux sont stérilisés à l'autoclave (121° pendant 10 minutes) coulés en boîtes de Petri stériles. Les boîtes de Petri, après refroidissement, sont inoculées avec 1, 2, ou 3 implantats d'un organisme, puis placées en étuve biologique (30°) pendant 10 jours. Ensuite les cultures sont examinées et la croissance évaluée selon les modalités suivantes :

0 = pas de croissance — organisme mort,

? = pas de croissance visible, mais organisme encore vivant,

1/2 = début de croissance — l'implantat est fixé sur le milieu,

1 à 1 $\frac{1}{2}$ = croissance très médiocre,

2 = croissance médiocre,

3 = croissance normale,

4 = croissance exubérante.

Les cultures en boîtes de Petri sont ensuite photographiées si nécessaire.

Pour exprimer l'activité (c'est-à-dire la toxicité de l'extrait), on a choisi comme critère *l'inhibition totale de la croissance* sur milieu de Sabouraud auquel il est incorporé en concentrations connues. Lorsque les organismes ne s'implantent pas sur le milieu gélosé, c'est que les cellules ne se divisent pas. Si on les réintroduit sur milieu de Sabouraud normal et qu'elles ne manifestent aucune reprise de croissance pendant 10 jours à 30°, nous les considérons comme tuées.

Le critère choisi est absolu et ne comporte aucune erreur d'appréciation, ce qui n'est pas le cas pour d'autres critères utilisés par divers auteurs. Nous appelons *limite de toxicité* la concentration la plus faible qui empêche toute croissance de l'implantat.

Détermination de la toxicité du Trichlorex.

C'est au moyen de 0,18 g d'huile extraite de 200 g de 2-4-5 T. technique que nous avons tenté le premier essai de limite de toxicité vis-à-vis de cinq organismes différents dans des milieux à pH 4. 9 ou 6. 9. Ces 0,18 g provenaient de l'extrait éthéré séché puis repris par un minimum d'éther désoxydé, mis en exsiccateur et en glacière pendant un mois.

Le tableau I (M. Bouillenne-Walrand, 1952) donne uniquement l'essai au pH 6.9 qui est le moins favorable pour déceler une activité fongicide (les résultats ont été les mêmes aux autres pH).

Tableau I

Limite de toxicité du Trichlorex ajouté en concentrations diverses au milieu Sabouraud au pH 6.9

	Concentrations en g ‰	0,18	0,09	0,045	0,0225	0,018
	Dilutions	1 /5555	1 /11.100	1 /22.200	1 /44.000	1 /55.500
Organismes Expérimentés	*Trichophyton schoenleini*	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	?
	Trichophyton interdigitale	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
	Candida albicans	0 0 0	0 0 0	0 0 0	3 3 3	3 3 3
	Nocardia africana	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 ?	1 1 1
	Trichophyton gypseum granulosum	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 ? 1	

La fig. I reproduit l'essai sur *Candida albicans*

Au pH de 6.9, la limite de toxicité du Trichlorex, extrait de 200 g de 2-4-5 T. sodique peut être exprimée de la manière suivante :

sur Trichophyton schoenleini	entre 1 /44.000 et 1 /55.000
sur Trichophyton interdigitale	vers 1 /55.000
sur Candida albicans	entre 1 /22.000 et 1 /44.000
sur Nocardia africana	entre 1 /44.000 et 1 /55.000
sur Trichophyton gypseum granulosum	entre 1 /22.000 et 1 /44.000

et l'ordre de résistance des organismes se présente comme suit :

Candida albicans > *Trichophyton gypseum granulosum* > *Nocardia africana* > *Trichophyton schoenleini* > *Trichophyton interdigitale.*

D'une manière générale, dans toute la série de nos essais biologiques, parmi plus de vingt cinq organismes pathogènes de l'homme ou des animaux, nous avons constaté que *Candida albicans* et d'autres *Candida*, comme *Candida parapsilosis*, sont les plus résistants et que *Trichophyton interdigitale* est le plus sensible.

Enfin, des essais sur microbes banaux, réalisés dans nos laboratoires et sur microbes pathogènes, effectués au laboratoire du Professeur Welsch à l'Université de Liège, ont montré qu'à la concentration de 1 /10.000 dans le milieu, le Trichlorex isolé et partiellement purifié est un ***bactéricide total.***

La conclusion de cette expérience est donc que le Trichlorex est un bactéricide et un fongicide puissant dont la limite d'activité est située sur un palier très différent de celui des 2-4-5 T. purs et autres herbicides sélectifs pour qui la concentration toxique est de l'ordre de 1 à 2 /1.000.

Technique adoptée pour l'extraction du Trichlorex.

Le procédé d'extraction a été approximativement le même pour toutes les séries expérimentales : 3 extractions successives à l'éther éthylique (1) désoxydé et sec du 2-4-5 T. sodique *séché*, chaque extraction dure de 2 à 5 jours (selon le poids de matière utilisée) et sous agitation continue sur agitateur électrique.

(1) Tous les solvants étaient redistillés au laboratoire avant d'être utilisés.

Expérience du 13 mars 1952.

FIG. I. — *Candida albicans*.

Cultivé sur milieu de Sabouraud à deux *p*H 4.9 et 6.9 et additionné de Trichlorex à des dilutions progressives.

Les extraits éthérés sont filtrés, réunis et concentrés au 1/10 environ du volume initial : il précipite une abondante masse cristalline jaune-brun (*A*), que l'on sépare de l'extrait (*B*) liquide.

Le précipité *(A)* est à nouveau extrait par un minimum d'éther ; l'extrait éthéré est évaporé ; on en sépare les cristaux blancs... et ainsi de suite jusqu'à ce que la masse cristalline qui reste soit *blanche*. Cette masse est principalement constituée de 2-4-5 T. acide (Pt. fusion 155°).

L'extrait éthéré purifié est réuni avec l'extrait *B*. Les extraits éthérés, débarrassés de la plus grande partie des matières cristallines blanches, sont évaporés. On obtient, en général, une masse huileuse, jaune, à Pt. fusion bas, 30°-40°C.

La limite de concentration active est située pour

Trichophyton interdigitale	entre 1/4.000 et 1/8.000
et pour *Candida albicans*	entre 1/2.000 et 1/4.000

Cette masse est extraite au Soxhlet pendant 8 jours avec l'éther de pétrole Merck (Pt. ébullition 40°-50°) jusqu'à ce que le résidu dans la cartouche d'extraction soit totalement décoloré. L'extrait à l'éther de pétrole est jaune ; il laisse déposer, au repos, des fines aiguilles (Pt. fusion 62-64°C). On sépare les aiguilles qui précipitent au fur et à mesure de l'évaporation de l'éther de pétrole. L'extrait sec final est à nouveau repris à l'éther de pétrole (Pt. d'ébullition 35°-40°C). Cette opération est répétée jusqu'à obtention finale d'une huile jaune à Pt. fusion 20-25°C., qui est le Trichlorex brut.

Le Trichlorex brut a une activité

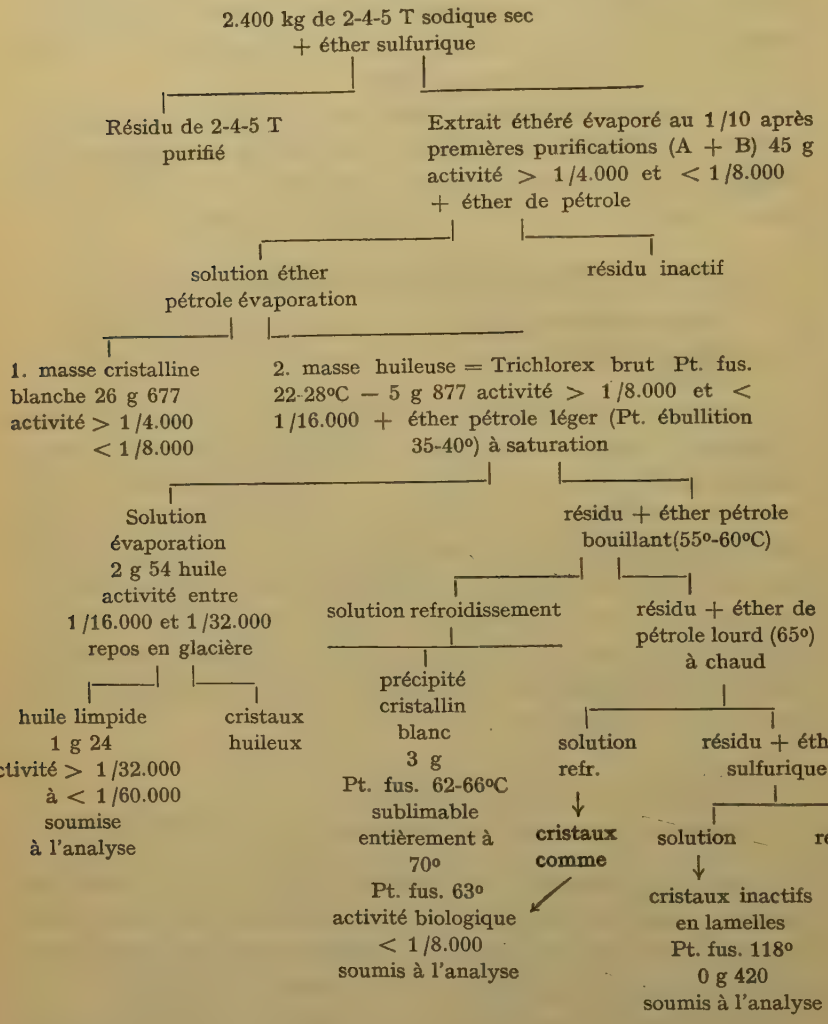
sur *Trichophyton interdigitale*	comprise entre 1/16.000 et 1/32.000

Si on laisse séjourner cette huile en glacière et en exsiccateur pendant plusieurs semaines, il s'en sépare encore une masse cristalline (Pt. fusion 62-70°C.) et finalement des tablettes ou bâtonnets translucides cireux à Pt. fusion 112-120°C.

A la longue, on recueille une très petite quantité d'une huile limpide, jaune clair, dont l'activité léthale se manifeste jusqu'à une dilution de 1/40.000 et au-delà.

Le schéma (tableau II) résume la marche des opérations effectuées sur 2.400 kg de 2-4-5 T. sodique sec.

Tableau II



Une séparation par chromatographie sur papier Wathmann imprégné de silicate de Mg a été réalisée en absorbant quelques ctg de l'extrait brut (provenant des 45 g du schéma précédent). En développant par chromatographie ascendante au moyen d'un mélange éther de pétrole (une part) éther éthylique (deux parts) on obtient trois zones bien séparées :

I — vers le bas, une zone blanc pur, chargée d'un corps cristallin en aiguilles fusibles à 62-63°C, et sublimant facilement et entièrement en-dessous de 72°C,

II — une zone intermédiaire jaune, cristalline, à point de fusion 31-48°C,

III — vers le haut, une zone jaune franc, libérant un produit huileux à point de fusion très bas, 26-30°C (environ 1/10 de la quantité de produit brut déposée sur le papier).

Le test biologique de l'activité de ces trois constituants montre entre eux de nettes différences, confirmées sur d'autres organismes.

	Trichophyton interdigitale	*Candida albicans*
Zone I	entre 1/ 4.000 et 1/ 8.000	1/2.000 et 1/ 4.000
Zone II	entre 1/10.000 et 1/16.000	1/4.000 et 1/ 8.000
Zone III	entre 1/16.000 et 1/30.000	1/8.000 et 1/16.000

De l'huile jaune de la zone III récupérée du chromatogramme et laissée en exsiccateur se séparent quelques cristaux en plaquettes translucides, fusibles à 115-118°C (voir schéma p. 923).

Au cours des purifications, nous retrouverons toujours les trois produits suivants (parmi beaucoup d'autres constituants moins bien définis [1]) :

1) Cristaux blancs en aiguilles fusibles à 62-64°, peu actifs, (I)

2) Huile jaune très active, qui est le Trichlorex, (III)

3) Tablettes translucides fusibles à 115-118°, inactives (II).

(1) Dans certains cas, en chromatographiant sur papier ou sur silice, nous avons obtenu une huile incolore et biologiquement inactive ; nous y reviendrons dans la 3e partie de notre étude.

Des analyses élémentaires du carbone, de l'hydrogène et du chlore sur les trois produits, isolés par extractions successives, ont été tentées à Liège (laboratoire du Centre de Recherches des Hormones Végétales) par M. P. Dury, assistant de Madame M. Bouillenne-Walrand et à Paris (laboratoire Lederer) par M. Kallos, assistant du Professeur Lederer. La recherche des autres éléments n'avait pu être entreprise à ce moment.

Nous résumons, dans le tableau suivant, les résultats obtenus en leur comparant des formules hypothétiques dans lesquelles l'oxygène a été introduit comme seul élément complémentaire.

TABLEAU III

Analyses effectuées à :

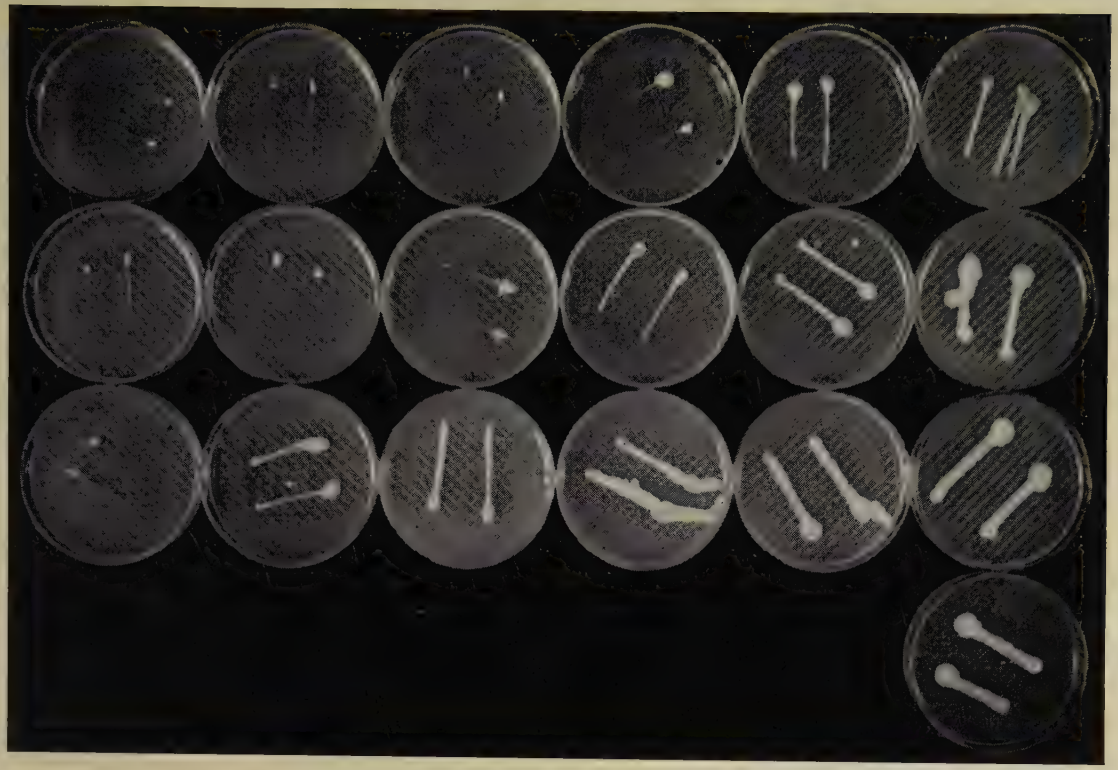
	LIÈGE	PARIS	
	en %	I. en %	II. en %
Produit cristallin	C : 40.29-40	39.72	39.66
blanc, aiguilles	H : 2.42-2.48	1.78	2.41
fusibles 60-66°	Cl : —	48.16	49.70
Théorie pour	$C_{10}H_4O_2Cl_4$:	$C_{10}H_6O_2Cl_4$	$C_7H_5O\,Cl_3$
	C : 40.26 :	40	39.66
	H : 1.34	2	2.36
	Cl : 47.64	47.35	49.59
Huile jaune	C : 42.88	44.90	36
	H : 3.13	3.41	2.56
	Cl : 41.8	40.57	53.75
Théorie pour		$C_{10}H_9O_2Cl_3$	$C_8H_6OCl_4$
	C : —	44.85	36.9
	H : —	3.36	2.3
	Cl : —	39.81	54.5
Plaquettes translucides	C : 46.03		
	H : 3.816		
Pt fusion	C : 33.76-	—	—
115-118C°	33.81		
	H : 1.07-1.95		

Dilutions des produits	1/20.000	1/40.000	1/60.000	1/80.000	1/120.000	1/160.000

Portions : I (0,125 gr)

II (0,373 gr)

III (0,1196 gr)



Témoin

Ph. : R. Sauveur.

Fig. III. — *Candida albicans.*

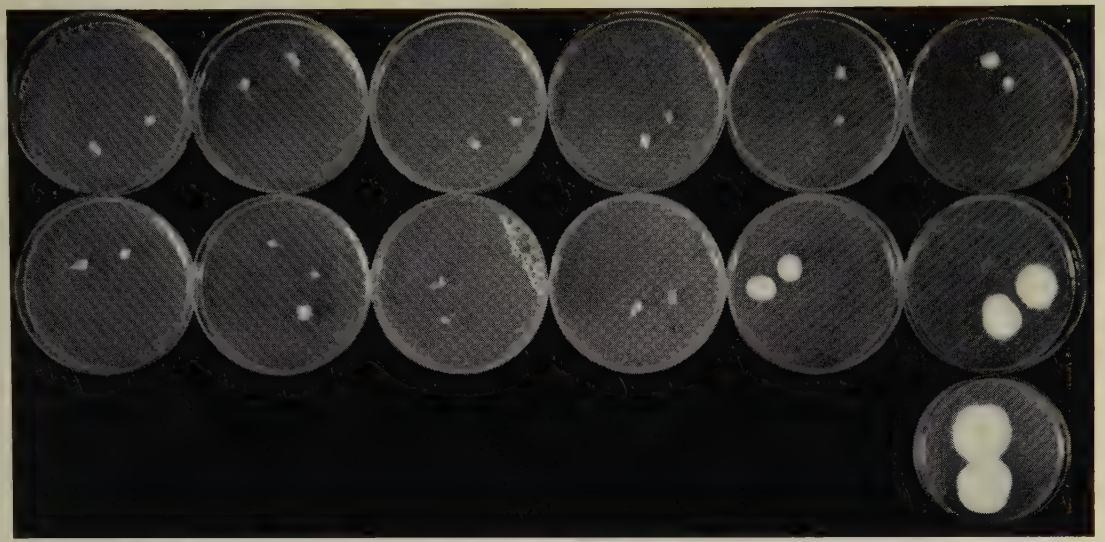
Cultivé sur milieu de Sabouraud *p*H 6.9 auquel sont incorporés les trois produits de tête de distillation. Chaque boîte de Pétri a reçu deux implantats. Les produits successifs de la distillation sont de moins en moins actifs.

Essai biologique du 26 juin 1956.
Action des produits de la distillation sous vide du Trichlorex but.
(Lots III et IV du tableau V).
Milieu de Sabouraud *p*H 6.9.

Dilution des produits	1/20.000	1/40.000	1/60.000	1/80.000	1/120.000	1/160.000

Portions : I (0,125 gr)

II (0,373 gr)



Témoin

FIG. IV. — *Trichophyton interdigitale.*

Ph. : R. SAUVEUR du 4-7-1956.

1re rangée horizontale : jusqu'à la concentration de 1/120.000 les implantats ne se sont pas développés.
2me rangée horizontale : jusqu'à la concentration de 1/80.000 les implantats ne se sont pas développés.

— Le produit cristallisé blanc à point fusion 63° et entièrement sublimable en-dessous de 70°C fut étudié spécialement par M. Kallos. Il fut identifié comme étant, en majeure partie, constitué d'un corps à point fusion 72° : trichloroanisol : C_7H_5 O Cl_3. Le trichloroanisol est le dérivé méthylé (OCH_3) du trichlorophénol. Son activité biologique est beaucoup plus faible que celle de l'huile ; elle n'est plus repérable au-delà d'une dilution de 1 /8.000 sur *Candida albicans*.

— L'huile jaune active, telle que nous l'avons obtenue, est le Trichlorex. Son analyse par voie chimique a soulevé des difficultés : ce n'est pas un produit pur et son activité dépend de son degré de purification.

— Les plaquettes translucides ont été identifiées comme étant du tétrachlorobenzène.

Le composé intéressant est donc l'huile jaune. Nous l'avons retrouvée dans les différents lots de 2-4-5 T. technique qui nous furent soumis depuis 1952 et que nous avons traités comme il a été dit plus haut. Nous avons vérifié ses propriétés léthales remarquables sur une vingtaine de microorganismes, cultivés en vitro. Le tableau IV indique les poids et rendements obtenus par le traitement de 5 lots de 2-4-5 T. ainsi que les limites de

TABLEAU IV

Rendements et limités d'activité antifongique
du Trichlorex isolé à partir de divers lots de 2-4-5 T. techniques
(Origine française)

Quantités de 2-4-5 T. Na mises en extraction	Poids de Trichlorex récolté en g	Limite d'activité pour *Trichophyton interdigitale*	% tage d'huile active	Ramené à une activité de 1 /10.000 (environ)
1952 – 250 g	0,22	entre 1 /40.000 et 1 /80.000	0,088	0,35%
1953 – 286 g	0,565	» 1 / 5.000 et 1 /10.000	0,21	0,20%
1953 – 2.450 g	5,87	» 1 / 8.000 et 1 /16.000	0,23	0,23%
1954 – 10.000 g	7,6	» 1 /16.000 et 1 /32.000	0,076	0,23%
1955 – 10.000 g	8,13	» 1 /16.000 et 1 /32.000	0,08	0,24%

toxicité sur *T. interdigitale* ; celles-ci varient selon le degré de pureté du produit isolé.

Si l'on ramène à une activité moyenne de $\frac{1}{10.000}$, les rendements en Trichlorex sont du même ordre pour les différents lots traités.

Essais de purification du Trichlorex brut.

A. — *Chromatographie sur colonne*

La purification, par passage du Trichlorex brut sur colonne chromatographique (alumine activée Merck ou mélange d'acide silicique Mallinckrodt et célite) et en utilisant comme éluants successifs l'éther de pétrole puis un mélange éther de pétrole + benzène, le benzène pur, un mélange benzène + éther sulfurique et enfin l'éther éthylique pur, permet de retrouver les constituants déjà décrits : trichloroanisol (PF 63°-70°) tétrachlorobenzène (PF 115°-118°) mais le composé actif de l'huile n'a pas pu être isolé de manière satisfaisante.

En outre, les résultats des diverses chromatographies n'ont pas été homogènes : un même lot de Trichlorex (15 g) traité en 6 répétitions sur colonnes chromatographiques d'acide silicique et célite n'a fourni qu'une seule fois un produit dont l'activité s'est montrée nettement supérieure à celle du Trichlorex de départ.

Dans certains cas, tout se passait comme si la colonne détruisait partiellement le complexe huileux : en fin du chromatogramme, nous avons souvent récolté une huile inactive (voir p. 954).

Une raison de cet échec est, pensons-nous que le Trichlorex de départ, n'étant pas assez pur, le chromatogramme est resté encombré de corps de compositions chimiques relativement voisines dont la séparation est imparfaite. On verra plus loin que la chromatographie sur colonne a pu être utilisée avec succès sur un produit beaucoup plus pur.

De nombreux corps furent synthétisés à l'Université de Liège, au laboratoire de Chimie du Professeur Baudrenghien, corps ayant des points de fusion voisins de ceux des produits obtenus

par chromatographie. Citons les dichloro-diméthoxy-1-4-benzène (2-5, 2-3, 2-6), les 3 dichlorodiméthoxytoluène, les 2-6 dichlorobenzoquinone et dichlorohydroquinone, le 2-3-4-6 tétrachlorophénétol et tous les isomères du 2-4-5 trichloroanisol ainsi que beaucoup d'autres.

Les activités fongitoxiques de tous ces corps furent déterminées. Aucun d'eux n'a manifesté une action comparable à celle de l'huile active (voir 3e note).

B. — *Distillation sous vide du Trichlorex brut*

La purification du Trichlorex par chromatographie s'étant avérée peu fructueuse, nous avons eu recours à la distillation sous vide poussé et à basse température. Les quantités de produit dont nous disposions étant très faibles nous avons utilisé un appareil à sublimation sous vide (0,2 à 0,5 mm de Hg), dans lequel une réfrigération puissante avait été réalisée (Fig. II).

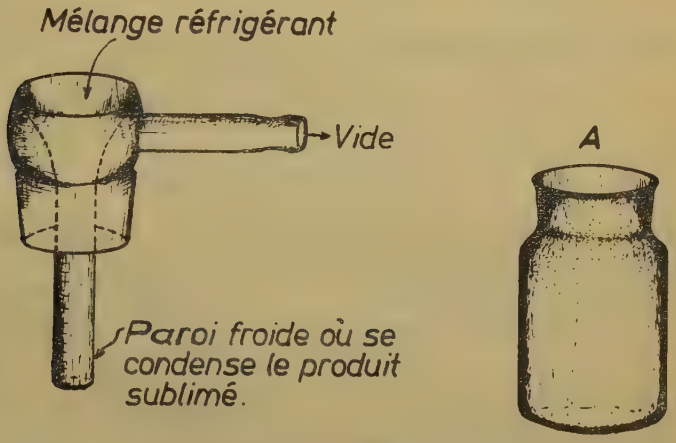


Fig. II.

La circulation d'eau du condenseur est remplacée par un mélange réfrigérant fixe de neige carbonique et d'acétone (-70°C). Le chauffage est réalisé par un bain de paraffine à hauteur variable.

Au moyen de ce système, on a distillé de nombreux lots de Trichlorex brut obtenu comme il a été dit. Nous donnons ici

TABLEAU V

Distillation sous vide poussé de Trichlorex brut extrait de 10 kg du produit brut : 1/20.000 ou à 1/32.000, selon les or-

	N° de la distillation	Fraction	Pression	Température en °C	Poids en mg
	I	1	0 – 5 mm	66 – 70	105
	508 mg	2	1 – 2 mm	76 – 116	66,7
	mélange d'huile et de cristaux	3	1 – 2 mm	76 – 116	34,2
		4 à 9	0 – 5 mm	116 – 160	245,8
					451,7
					perte 49
	II	1	0 – 5 mm	21 – 32	1,9
	508 mg	2	0 – 5 mm	32 – 47	5
	mélange d'huile et de cristaux	3	0 – 5 mm	47 – 55	25,9
		4	0 – 5 mm	55 – 68	28,4
		5	0 – 5 mm	68 – 75	65
		6 à 10	0 – 5 mm	75 – 110	368
					perte 13,8
26 juillet 1956	III et IV huile 1 g et 1.0509 – on réunit les produits de sublimation correspondants	1	0 – 5 mm	20 – 50	125
		2	0 – 5 mm	50 – 70	373
		3	0 – 5 mm	50 – 80	119,6
		4	résidu	80	1.214
					perte 0,19
	V. cristaux en plaquettes	1	0 – 5 mm	20 – 59	68
	Pt fus. 50-118$_0$ séparés de l'huile brute mais encore imprégnés d'huile 0,8413 g	2	0 – 5 mm	59 – 69	75
		3 à 6	0 – 2 mm	69 – 103	690
20 décembre 1956	VI et VII – 1 g et 1 g 32 – huile débarrassée des cristaux V	1	0 – 5 mm	20 – 50	170
		2	0 – 5 mm	50 – 60	365
		3	0 – 5 mm	60 – 70	167
		4	résidu	70	1.371
					perte 0,24

de 2-4-5 T., 6,22 g — Limite d'activité antifongique
ganismes : Candida albicans et Trichophyton interdigitale.

Aspect	Pt. fusion des cristaux en C°	Durée de la distil-lation	Activité toxique Limite pour C. albic.	Trich. int.	Fluores-cence aux U. V.	Rende-ment en %	
huile jaune + cristaux	37 – 72	2 h 30	> 1 /32.000	> 1 /60.000	jaune clair	20	
cristaux gras	35 – 55 – 102	2 h	1 /10.000		jaune vert	13,34	
cristaux	65 – 130	8 h	1 / 8.000		vert clair	68,4	
masse			inactif			9,8	
—	70	2 h	inactif		peu		
huile jaune-clair + cristaux	39 – 47	1 h 1 /4	1 /25.000	< 1 /50.000	jaune clair		
huile jaune + cristaux	50	1 h 1 /4	> 1 /30.000	< 1 /30.000	jaune clair	24,8	
huile jaune + cristaux	30 – 80	1 h 1 /4	> 1 /40.000	< 1 /75.000	peu		
huile + cristaux	22 – 70	1 h 1 /4	⩽ 1 /20.000	> 1 /20.000	vert clair		
	45 – 100	6 h	inactif		vert	72,4	
						3	
huile + cristaux	123 – 125	1 h 30	> 1 /60.000	> 1 /120.000	jaune	5,85	
huile + cristaux	115 - 125	3 h	> 1 /40.000	> 1 / 80.000	jaune	18,4	30,1
bâtonnets	60	2 h	⩽ 1 /20.000	⩽ 1 / 40.000	vert clair	5,85	
huile + cristaux	100		inactif		vert clair	52	
huile		1 h 30	> 1 /40.000	> 1 /80.000	jaune	8,08	
cristaux jaunes		2 h	inactif		jaune vert		
cristaux		8 h	inactif		vert		
huile		3 h	> 1 /40.000	> 1 /80.000		7,3	
huile		4 h	> 1 /20.000	> 1 /40.000		23	30,3
cristaux huileux		4 h	⩽ 1 /10.000	> 1 /10.000		7,1	
		0	inactif			53	
						10	

Les signes >, <, ⩽ indiquent une limite de toxicité, au delà de, en deçà de, approximativement égale à

les résultats de la distillation de 6,22 g retiré des 8,13 g du tableau IV, dernière ligne.

Ces 6,22 g sont distillés en 7 fois.

Le tableau V indique les résultats des opérations ainsi que l'activité antifongique des diverses portions de produits sublimés.

Les résultats cette fois sont très nets et reproductibles : la distillation sous pression réduite (0,5 mm) et température de 20 à 75° permet de retirer, en tête de distillation, toutes les portions douées d'activité antifongique.

Si on réunit tous les distillats dont l'activité dépasse 1 /20.000 quel que soit l'organisme, on a le tableau récapitulatif suivant (tableau VI). On y voit que les rendements en huile active sont du même ordre de grandeur, exception faite pour la portion V qui était constituée de plaquettes résiduelles inactives, mais imprégnées d'huile.

TABLEAU VI

N° des distillations	Quantité soumise à la sublimation en mg	Quantité de produit actif récolté en mg	Pourcentage par rapport au Trichlorex brut	Limite d'activité toxique
I	500	105	20	
II	509	126,3	24,6	entre
III et IV	2 050	617,6	30,1	1 /20.000
V	841	68	0,8	et
VI et VII	2 327	535	23	1 /100.000

Le tableau VII donne les toxicités des portions actives des distillations III + IV du tableau V et les figures III et IV illustrent cette expérience sur *Candida albicans* et sur *Trichophyton interdigitale*. Ces figures démontrent clairement que la distillation sous vide poussé constitue un excellent moyen de purification du Trichlorex brut. C'est ce dernier procédé qui sera utilisé dans la suite.

Si on tient compte du fait que d'une part, le produit de départ, huile brute, possède une activité limite voisine de 1 /20.000 et que, d'autre part, la distillation fournit entre 20 et 27 % de produit très actif, nous devrions escompter avoir obtenu un ou

Action des produits de la distillation du Trichlorex brut (III et IV du tableau V) sur *Candida albicans*, *Trichophyton interdigitale* et *Trichosporon cutaneum*.

Dilution des produits dans le milieu de culture Sabouraud au pH6.9.

Distillation sous 0,5 mm de 2 g 0,5 d'huile brute (III et IV) action des distillats obtenus	1 /20.000	1 /40.000	1 /60.000	1 /80.000	1 /120.000	1 /160.000	Témoins
Portion 1 (125 mg)							
Candida albicans	0 0	0 0	0 0	1 1	1 ½ 1 ½	2 2	3
Trichophyton interdigitale	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	½ ½	3
Trichosporon cutaneum	0 0	0 0	0 0	0 9	? ?	½ ½	3
Portion 2 (373 mg)							
Candida albicans	0 0	0 0	½ ½	1 ½ 1 ½	2 2	3 3	
Trichophyton interdigitale	0 0	0 0	0 0	0 0	1 1	1 ½ 1 ½	
Trichosporon cutaneum	0 0	0 0	0 0	½ ½	1 ½ 1 ½	2 2	
Portion 3 (119 mg 6)							
Candida albicans	? ?	1 1	1 ½ 1 ½	3 3	3 3	3 3	
Trichophyton interdigitale	0 0	? ?	1 ½ 1 ½	2 2	3 3		
Trichosporon cutaneum	0 ?	2 2	2 2	2 2	2 2		
Portion 4	1 /10.000	1 /20.000	1 /40.000	1 /60.000	1 /80.000		
Résidu de la distillation (1 g 214)							
Candida albicans	3	3	3	3	3		
Trichophyton interdigitale	2	3	3	3	3		
Trichosporon cutaneum	2	3	3	3			

des produits dont l'activité serait multipliée par 4 ou 5 vis-à-vis de l'huile brute ; soit 1 /80.000 et 1 /100.000. Nous enregistrons en réalité une multiplication par 3 ou 4 de l'activité maximale.

Un autre point important est que l'huile, mise en réserve dans un tube hermétiquement fermé, se conserve fort bien : 9 mois après les distillations (soit en fin d'année 1957), les résultats biologiques sont restés sensiblement les mêmes qu'au moment de l'extraction.

Le tableau V révèle, en outre, que nous avons obtenu rarement un produit huileux dont l'activité léthale sur *Trichophyton interdigitale* se manifeste à des dilutions au-delà de 1 /120.000. En général, la limite de toxicité des produits les plus actifs est comprise entre 1 /80.000 et 1 /120.000, pour cet organisme, et aux environs de 1 /60.000 pour *Candida albicans*.

Nous donnerons une explication valable de ces résultats ultérieurement.

Conclusions

1) Les différents lots de 2-4-5 T sodique que nous avons expérimentés contiennent comme impureté un produit huileux que l'on peut extraire à l'éther éthylique et qui présente, sur les microorganismes, levures, champignons inférieurs, une action toxique et léthale beaucoup plus importante que le 2-4-5 T lui-même.

2) La chromatographie sur colonne d'un extrait pur, même après extractions successives par l'éther de pétrole, ne donne pas de résultats constants et ne constitue pas un bon moyen de purification.

3) La distillation sous vide poussé du produit huileux à des températures ne dépassant pas 60 à 70°C, permet de séparer dans les portions de tête une huile très active constituant environ le 1 /4 du produit initial et présentant une activité 3 à 4 fois plus élevée que le produit brut. Cette huile que nous dé-

signons sous le nom de Trichlorex est un corps stable et homogène, distillant sous pression réduite.

Dans la prochaine communication, nous verrons que par chromatographie l'huile active, purifiée par distillation de l'extrait brut peut être dissociée en deux constituants dont les analyses chimiques et physiques ont permis l'identification. La composition du Trichlorex sera ainsi déterminée et sa structure établie. Enfin, sa reconstitution synthétique conduira à un produit ayant les mêmes propriétés physiques, chimiques et biologiques que le corps extrait.

(à suivre)

Extrait du *Bulletin de l'Académie royale de Belgique* (Classe des Sciences)
Séance du 7 octobre 1961

BIOLOGIE VÉGÉTALE

SUR LES PROPRIÉTÉS ANTIBIOTIQUES DU TRICHLOREX ET LA RÉALISATION DE SA SYNTHÈSE

III. Purification, analyse, structure moléculaire et synthèse du Trichlorex,

par M. BOUILLENNE-WALRAND, J. KHALADJI
et G. WETROFF (*).

Dans deux communications précédentes (I) et (II) (**), on a montré que le 2-4-5 T technique étudié par nous contient une impureté douée de propriétés antibiotiques remarquables, que celle-ci y existe en très faible proportion, 0,08 à 0,1 % environ, qu'elle se présente comme une huile distillant en dessous de 70°C, sous pression réduite (0,5 mm). On a aussi souligné les difficultés que présente la séparation du Trichlorex d'avec les nombreux corps qui l'accompagnent dans les 2-4-5 trichlorophénoxy-acétates de soude techniques.

Pour entreprendre l'identification de cette huile, il fallait disposer d'un échantillon suffisamment important et homogène sur lequel pourraient être effectuées les différentes opérations analytiques. Un lot de 1.900 kg de 2-4-5 trichlorophénoxyacétate de Na technique a été traité au moyen d'éther sulfurique dans un appareillage spécialement construit. La distillation fractionnée sous vide poussé de l'extrait brut a permis d'isoler une fraction très active qui a, elle-même, été soumise à la chromatographie d'élution.

(*) M. Bouillenne-Walrand, Centre de Recherches des Hormones Végétales Université de Liège et Institut Belge pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture.

J. Khaladji et G. Wetroff, Centre de Recherches Pechiney à Aubervilliers, Paris.

(**) Bull. Ac. Roy. Sc. Belg. 1961.

L'analyse chimique et la spectrographie infrarouge ont permis d'en identifier les constituants et d'établir que la substance active était une association équimoléculaire de phosphate triisobutylique et de 2-4-5 trichlorophénol.

Extraction du Trichlorex brut en Atelier-Pilote.

Afin de pouvoir obtenir une quantité suffisante de Trichlorex brut en vue de l'identification de ses composants, il a été décidé de traiter une quantité importante de 2-4-5-T : 1.900 kg et d'installer d'un appareil semi-industriel d'extraction.

Le 2-4-5 trichlorophénoxyacétate de sodium industriel est un solide blanc, légèrement rosé, aggloméré en blocs compacts en raison de sa forte teneur en humidité. L'extraction des impuretés qu'il contient devra se faire, soit directement par un solvant hydrophile, soit par un solvant hydrophobe, mais après séchage de la substance. Tenant compte des nécessités de mise au point d'une extraction systématique en grand, on a préalablement recherché la valeur de la perte en eau du produit, à une température donnée.

1) *Séchage du produit brut.*

Un échantillon de 7,1172 g de 2-4-5 T brut, séché à l'étuve à 110°C à poids constant, perd 2,4588 g correspondant à une teneur initiale en eau de 34,5 %. Le produit sec fond à 269-270°C (bloc Maquenne).

La détermination de la perte de poids en fonction du temps a été effectuée sur un échantillon de 1.688 g de produit brut, dans une étuve ventilée à 66-70°C. Les pesées (tableau I), effectuées d'heure en heure sont reportées sur une courbe (fig. I).

La perte de poids, linéaire au début du séchage atteint son maximum, soit 37,5 % au bout de 7 h. C'est le temps minimum que nous adopterons pour la suite du travail.

La différence avec la détermination précédente provient de ce que les deux échantillons ont été prélevés dans deux fûts différents de 2-4-5 T industriel.

TABLEAU I. — Séchage du 2-4-5 T brut.

Temps de séchage	Température °C	Perte de poids g	Perte %
0	69	0	0
1	69	140	7,5
2	66,5	265	14
3	68,5	405	21,5
4	70,5	520	27,5
5	70,5	625	33,5
6	66	700	37,5
7	66	700	47,5
8	66	700	37,5
9	66	700	37,5

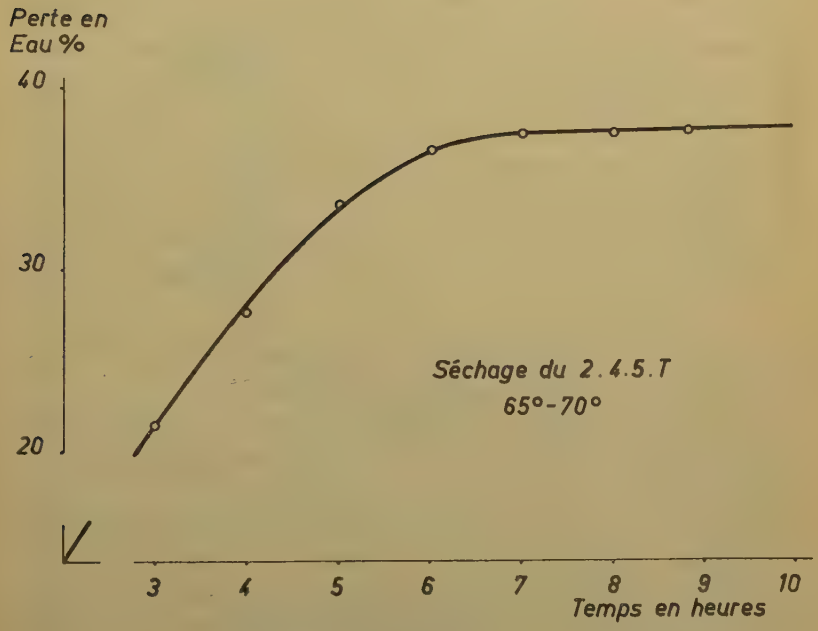


FIG. I

2) *Procédés d'extraction.*

Trois solvants ont été essayés dans lesquels le 2-4-5 T est peu soluble ; ce sont : l'acétone, l'éther éthylique et l'éther de pétrole. Avec chacun d'eux, nous avons procédé à des essais d'extraction :

— soit par malaxage du 2-4-5 T en bouillie dans le solvant, filtration sur verre fritté et lavage.

— soit par extraction au Soxhlet.

Dans chaque essai, environ 1 kg de produit sec est mis en œuvre ; après évaporation du solvant, le résidu est repris par 100 cm^3 d'éther de pétrole. Cette solution, mise à refroidir pendant 24 h. à — 10°C, laisse déposer des cristaux blancs de 2-4-5 T que l'on sépare avant d'évaporer le solvant et de sécher sous vide le résidu final. Dans le tableau II, nous indiquons pour chaque essai la proportion de Trichlorex extrait :

Tableau II.

Procédés	Solvants		
	Acétone	Éther éthylique	Éther de pétrole
Malaxage	0,36‰	1,18‰	0,30‰
Soxhlet		1,43‰	

Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment dans les essais de laboratoire (voir p. 923, note II).

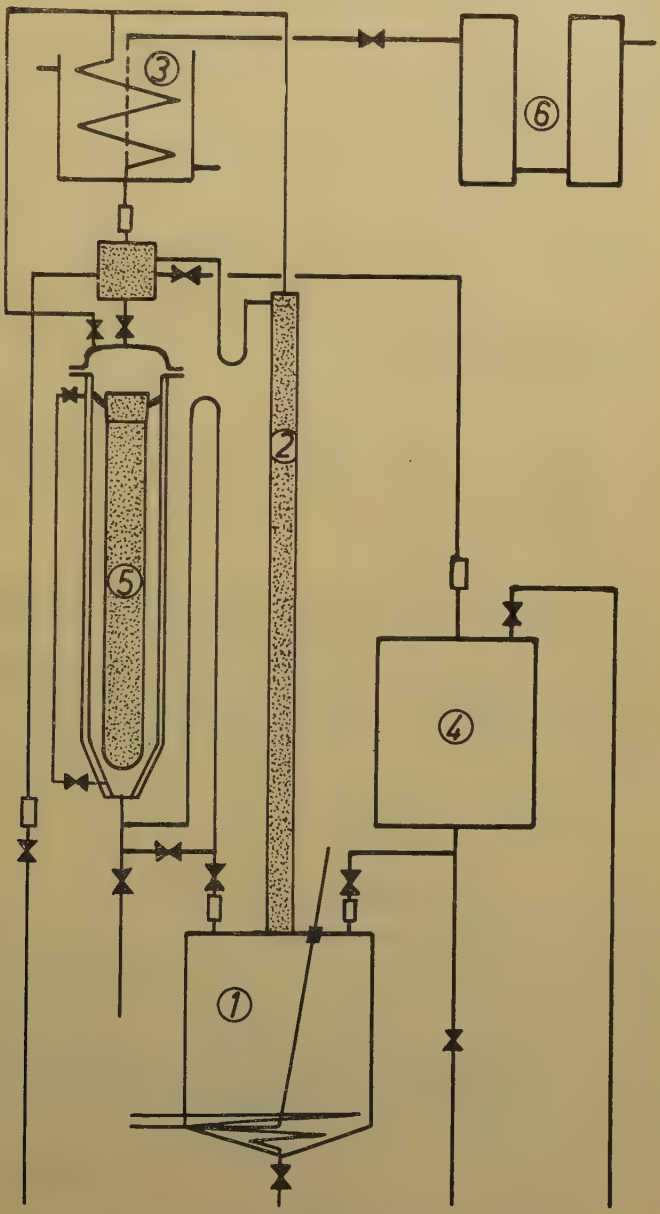
C'est l'éther éthylique qui permet d'obtenir la plus forte proportion d'extrait. L'éther de pétrole est moins efficace car il mouille mal le 2-4-5 T qui reste aggloméré en blocs. L'acétone permet d'opérer sur le produit humide, mais elle donne un produit brun foncé.

L'extraction au Soxhlet, plus longue que le malaxage est un peu plus efficace. C'est elle que nous allons utiliser pour le traitement d'un lot important de 2-4-5 T.

3. *Appareillage.*

L'extracteur de Soxhlet utilisé se compose essentiellement (fig. II) :

Fig. II.



Appareil à extraction (Atelier-Pilote)

1. D'une chaudière de 200 l chauffée par un serpentin à circulation de vapeur d'eau. Le fond cônique de cette chaudière permet de concentrer son contenu à 15 l et une vanne à la partie inférieure est destinée à soutirer le résidu liquide.

2. D'une colonne en acier de 4,5 m de haut et 50 mm de diamètre intérieur. Elle est calorifugée extérieurement et garnie d'un remplissage d'anneaux Raschig de 15 × 15 mm.

3. D'un condenseur constitué d'un serpentin en acier inoxydable refroidi extérieurement dans un bac à circulation d'eau.

4. D'un bac à réception de 260 l destiné à contenir le solvant distillé.

5. D'un extracteur de 1,80 m de hauteur et 32 cm de diamètre intérieur, muni à sa partie supérieure d'un couvercle amovible. D'une capacité de 70 l, il reçoit une cartouche en toile d'alumine pouvant contenir environ 23 kg de 2-4-5 T. Une double enveloppe chauffante permet de distiller l'éther retenu par le 2-4-5 T avant d'ouvrir l'appareil.

6. D'une garde à sable

Après montage, l'ensemble de l'appareillage est nettoyé au dichloréthane puis à l'éther. Le stock d'éther destiné aux extractions (1600 l) y est ensuite distillé et recueilli dans des fûts sur chacun desquels on détermine la teneur en résidu sec. Celle-ci ne dépasse pas 0,002 g /l, soit au total 2,7 g d'impuretés qui seront introduites par le solvant.

4. *Déterminations préliminaires.*

1. Épuisement des cartouches vides.

L'appareil contenant les cartouches vides est mis en fonctionnement avec environ 100 l d'éther. Un prélèvement est effectué chaque jour (soit après 6 vidanges du soxhlet) sur le liquide retournant à la chaudière. La teneur en impuretés, élevée au début devient constante et égale à 0,85 mg /l après 40 passages.

2. Détermination du nombre de passages nécessaires à l'extraction du Trichlorex.

Une cartouche contenant 18,6 kg de 2-4-5 T est épuisée par

180 l d'éther. A chaque vidange du Soxhlet un échantillon de 1 litre de solution est prélevé sur le retour à la chaudière. Le solvant est évaporé et le résidu (huileux, brun foncé) est séché à 70°C sous 11 mm de mercure, pendant 1 /2 heure avant d'être pesé.

Nous avons effectué 15 passages successifs, le remplissage demandant chaque fois 2 h 45 mn. Les contrôles fréquents au début, ont été plus espacés en fin d'opération (tableau III).

TABLEAU III. — Contrôle de l'extraction du Trichlorex.

Passage n°	Produit extrait	
	g /l	‰ du 2-4-5-T
1	0,1680	0,1651
2	0,0492	0,0453
3	0,0270	0,0265
5	0,0121	0,0114
7	0,0055	0,0049
9	0,0039	0,0039
11	0,0062	0,0050
15	0,0045	0,0032

La proportion de substance extraite reste pratiquement constante à partir du 7e passage (fig. III). En interpolant et en faisant la somme après chaque passage, nous trouvons que huit passages permettent de recueillir *1,23 g* de Trichlorex brut par kg de 2-4 5 T, soit environ 86 % de ce qui a été trouvé au laboratoire.

5) Traitement du stock de 2-4-5 T brut.

Au départ, le lot de 2-4-5 Trichlorophénoxy-acétate de sodium brut et séché dans une étuve à circulation d'air chaud à 70C°. pèse 866 kg.

Le traitement à l'éther dans le Soxhlet de l'atelier pilote est divisé en deux séries d'opérations, TA et TB.

Chaque opération s'étend sur 24 heures, mettant en jeu environ 23 kg de 2-4-5 T sec. La durée de remplissage de l'extracteur est de 3 heures.

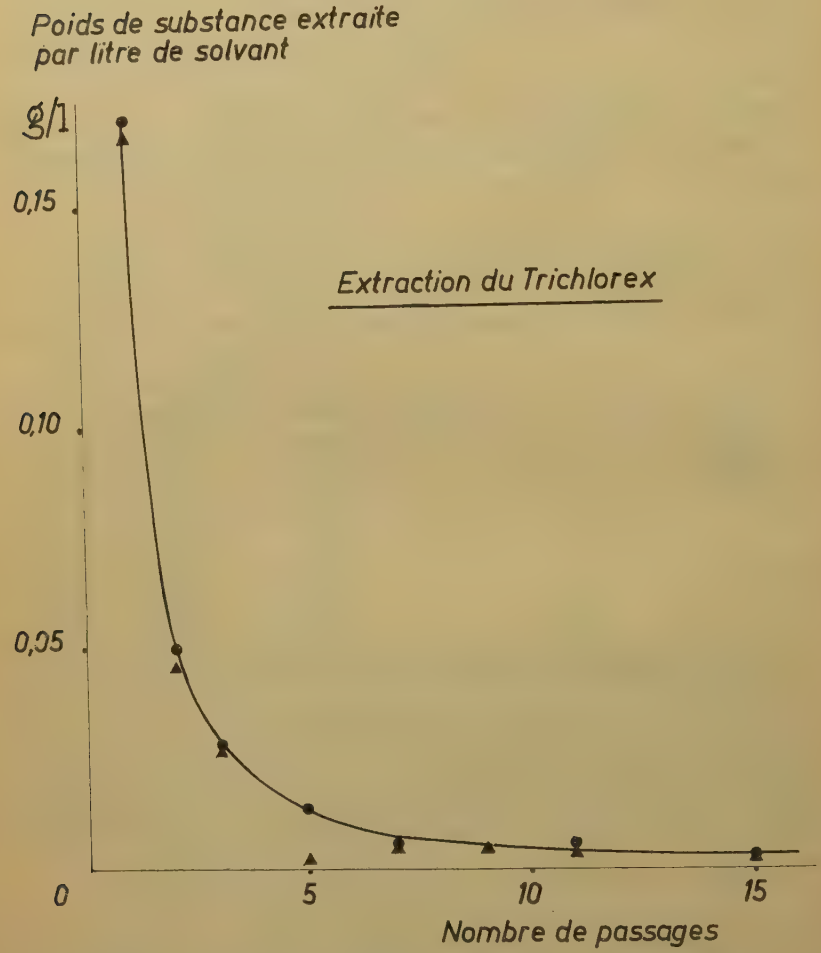


Fig. III.

A la fin de chaque série, la solution concentrée à environ 15 l avant d'être soutirée, est évaporée complètement sous vide (11 mm de Hg) au bain marie. Elle laisse un résidu huileux rouge brun ; un produit sublimé se dépose en longues aiguilles incolores dans le réfrigérant. C'est du 1-2-4-5 tétrachlorobenzène (Tf. = 139°C).

Les résultats des deux séries d'opérations sont exposés dans le tableau IV :

TABLEAU IV. — Extraction à l'éther du 2-4-5 T sec.

Série d'opérations	Nombre d'opérations	Poids de 2-4-5 T traité kg	Trichlorex brut obtenu	
			poids g	% de 2-4-5 T
TA	13	293	253	0,865
TB	24	516	426	0,825
Total	37	809	679	0,839

II. PURIFICATION DU TRICHLOREX.

Comme il a été dit dans la deuxième communication, parmi les différents procédés de fractionnement que nous avons mis en œuvre, c'est la distillation sous vide poussé qui a permis d'isoler les fractions les plus actives. D'autres procédés tels que l'extraction à la ligroïne, l'entraînement à la vapeur d'eau, la cristallisation fractionnée dans l'alcool, l'hydrolyse après saponification par la soude, conduisent à des fractions ayant des activités voisines entre elles et en général faibles.

L'efficacité du fractionnement est contrôlée en déterminant l'activité biologique de chaque fraction sur les cultures de champignons pathogènes de l'homme qui ont été expérimentées dans le essais précédents :

Trichophyton interdigitale Priesley.
Trichosporon cutaneum (de Beurm., Gougerot et Vaucher) Ota.
Candida albicans (Robin) Berkh.
Candida parapsilosis (Ashf.) Langeron et Talice.

La technique de culture des microorganismes et le mode d'évaluation de l'activité des produits récoltés ont été exposés p. 921, note II.

Le Trichlorex brut est d'abord distillé dans une colonne de 30 cm ($\phi = 20$ mm) à remplissage d'anneaux hélicoïdaux ($\phi = 4$ mm), sous vide de pompe à palette. Les produits légers, condensés dans le piège (1,5 %) ainsi que le résidu au moment où

commence la décomposition (57,5 %) sont inactifs. Le distillat (T 1) qui atteint *40 g* pour 97,5 g de produit mis en œuvre possède les activités suivantes :

Trichophyton interdigitale	> 1 /80.000	< 1 /100.000
Candida parapsilosis	> 1 /60.000	< 1 /80.000
Candida albicans	> 1 /40.000	< 1 /60.000

Cette fraction est reprise dans une colonne à bande tournante de 50 cm de longueur (Rin 3) ayant une efficacité de 24 plateaux théoriques. En opérant sous vide de trompe à mercure, nous isolons les fractions indiquées dans le tableau V.

Tableau V. — Distillation de la fraction T1.

Fraction n°	T °C	Pression mm	Poids g	Observations
T11	30 à 65	0,15	1,2	Sublime (Tf = 136°C) 1-2-4-5 tétrachlorobenzène
T12			1,5	Piège
T13	127	0,4	11,3	Fraction huileuse
T14	130	0,4	9,5	» pâteuse
T15	130	0,4	8	» »
T16			5	Résidus

Les trois fractions principales ont été soumises à l'analyse élémentaire (C, H, Cl) en même temps que l'activité biologique était déterminée.

La fraction T13 est la plus active, alors que la fraction lourde T15 est inactive. La fraction intermédiaire T14 a été obtenue dans les mêmes conditions que T15, mais elle contient un peu de la fraction précédente, ce qui lui confère une légère activité. C'est dans la fraction T13 que nous allons rechercher le principe actif du Trichlorex. Auparavant, nous allons en soumettre une partie (5,9 g) à une nouvelle distillation dans une colonne à bande tournante (6 plateaux théoriques). L'indice de réfraction

TABLEAU VI. — Activités biologiques et analyse des produits de distillation de T1.

Fraction n°	Analyse élémentaire			Activité biologique	
	C	H	Cl	Trichophyton interdigitale	Candida albicans
T13	54,02 54,34	7,81 7,98	19,45 19,73	> 1 /80 .000 < 1 /100.000	> 1 /40.000 < 1 /80.000
T14	70,35 70,62	8,63 9,40	7,86 8,32	> 1 /10 .000 < 1 /20.000	> 1 /5.000
T15	77,01 77,18	12,42 11,30	6,06 6,10	Inactif	Inactif

de chaque fraction est déterminé, ainsi que son activité biologique.

Les fractions T132 et T133 ont sensiblement le même indice de réfraction que le produit initial et leur activité est du même ordre de grandeur.

Les fractions doivent correspondre à un corps défini, qui serait le principe actif du Trichlorex, et que nous allons essayer d'identifier.

TABLEAU VII. — Distillation de la fraction T13 ($n_D^{20} = 1,4734$).

Fraction n°	T °C	Pression mm	Poids g	n_D^{20}	Activité biologique		
					Trichophyton interdigitale	Candida parapsilosis	Candida albicans
T 131	78	0,03	1,3	1,4582	> 1 /32 .000 < 1 /64 .000	> 1 /32 .000 < 1 /64 .000	> 1 /32.000 < 1 /64.000
T 132	82	0,02	1,9	1,4760	> 1 /64 .000 < 1 /100.000	> 1 /64 .000 < 1 /100.000	> 1 /32.000 < 1 /64.000
T 133	84-87	0,01	1,5	1,4788	> 1 /100.000 < 1 /128.000	> 1 /100.000 < 1 /128.000	> 1 /32.000 < 1 /64.000
T 134	Résidus	1,0					

III. Identification des constituants du trichlorex.

Outre l'analyse chimique, on a eu recours à la spectrographie infrarouge pour déterminer la nature des constituants du trichlorex.

1) *Spectrographie infrarouge des fractions de distillation* (1).

Les spectres d'absorption dans l'IR des trois fractions de distillation du T13 ont été enregistrés sur le même diagramme (fig. IV). Les produits sont examinés non dilués, entre lames de ClNa avec un prisme de même matière. Les trois spectres sont très voisins, en particulier ceux des échantillons T132 et T133 qui sont rigoureusement semblables. Ce résultat ne surprend pas, leurs activités biologiques et leurs indices de réfraction étant eux-mêmes du même ordre de grandeur.

Ces trois fractions présentent à 675-730-870-1120-1395 et 1595 cm^{-1} des bandes d'absorption caractéristiques du 2-4-5 trichlorophénol (fig. V). Ce produit dont la concentration semble être un peu plus faible dans l'échantillon T131 moins actif pourrait donc être le constituant actif du Trichlorex mais de nombreuses bandes d'absorption restent inexpliquées, en particulier à 2970-1375-1275 et 1025 cm^{-1} et il manque, vers 3.500 cm^{-1}, la bande de la liaison chélate caractéristique d'un phénol chloré en α. D'autres substances se trouvent donc en présence du trichlorophénol et modifient son état moléculaire.

Pour les identifier, une séparation plus fine que la distillation paraît nécessaire. On a fait appel à la chromatographie d'élution sur silice.

2) *Chromatographie sur silice de la fraction T131.*

Ce sont les têtes de distillation qui contiennent le moins de trichlorophénol. On a opéré sur environ 1 g de substance dissoute dans la ligroïne. Après avoir déposé l'échantillon sur une colonne

(1) Les spectres d'absorption dans l'infrarouge ont été réalisés et interprétés par M. Larnaudie et Mme Cirendini que nous remercions pour leur concours.

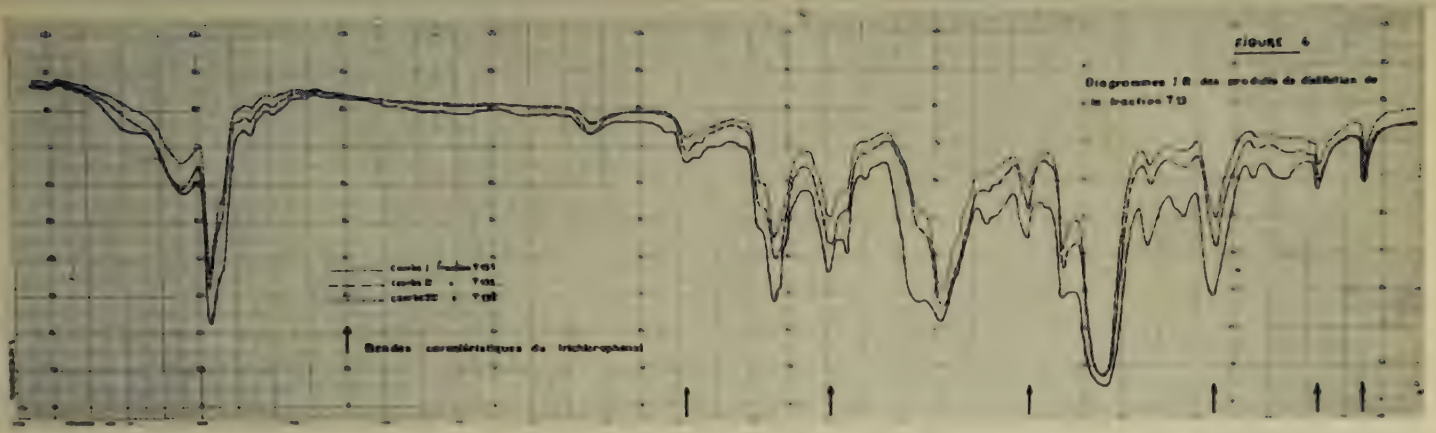


FIG. IV.

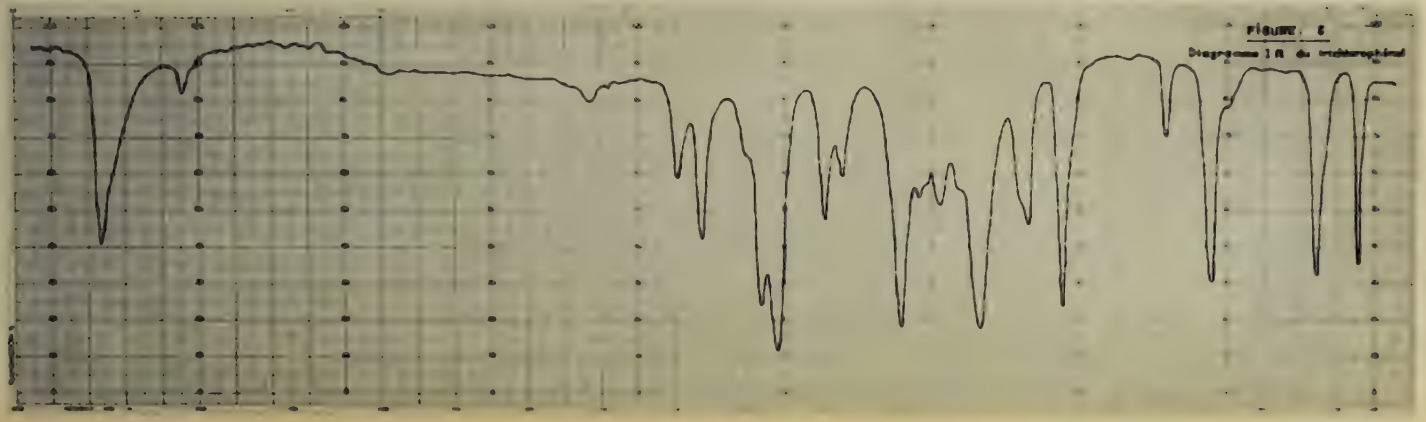


FIG. V

de silice de 19 cm de longueur, lavée à la ligroïne, on a élué avec 15 cm³ d'acétone. La solution recueillie à la base est fractionnée en volumes d'autant plus faibles qu'ils sont fortement colorés. On obtient ainsi les 8 échantillons suivants :

TABLEAU VIII.

Fraction n°	Volume de la solution cm³	Poids du résidu mg	Poids / Volume mg /cm³	Observations
CO 0	5	8,8	1,76	Solution dans la ligroïne Tf = — 5°C
CO 1	2	24,6	12,3	
CO 2	1	25,4	25,4	Cristaux + huile
CO 3	1	193,3	193,3	Produit huileux
CO 4	0,6	150,7	251	»
CO 5	1,5	352,4	235	»
CO 6	1	58,8	58,8	»
CO 7	1	8,2	8,2	Cristaux Tf = 137°C
CO 8	3	7,5	2,5	

Le chromatogramme ne présente qu'une seule vague, le nombre des fractions étant trop faible. Par contre, l'étude des éluats fait apparaître trois produits différents :

— En tête (CO1-CO2), un produit soluble dans la ligroïne cristallisant facilement et ayant une forte odeur de trichlorophénol, ce qui confirme les résultats des précédents spectres IR. Sa proportion est très faible.

— En queue (CO7-CO8), quelques cristaux fondant à 137°C : un résidu de 1-2-4-5 tétrachlorobenzène.

— Enfin (CO3-CO4-CO5-CO6), le produit principal, huileux dont nous allons étudier le spectre d'absorption dans l'infrarouge, sur les fractions susceptibles de contenir le moins de 2-4-5 trichlorophénol.

3) *Spectrographie infrarouge des fractions de chromatographie.*

Les spectres d'absorption des fractions CO5 et CO6 (les plus éloignées de celles contenant des cristaux de trichlorophénol) sont semblables (fig. VI). Les bandes du trichlorophénol, très atténuées, permettent de dégager le spectre du *phosphate triisobutylique* que nous avons enregistré sur le même diagramme et dont la bande à 1025 cm^{-1} est caractéristique de la liaison P-O-R. L'analyse élémentaire indique 9,97 % de phosphore dans la fraction CO5, contre 11,65 % dans le phosphate pur. Seules deux bandes surtout visibles sur les spectres de la fig. 4 restent encore inexpliquées à 3100 et 1240 cm^{-1}, dont il faut étudier l'origine. Auparavant, ayant déjà identifié deux constituants de Trichlorex, le 2-4-5 trichlorophénol et le phosphate triisobutylique, nous allons essayer de doser ces substances.

4) *Dosage du trichlorophénol et du phosphate triisobutylique dans la fraction de distillation T132.*

a) *Dosage chimique du trichlorophénol.*

Le trichlorophénol possède un hydrogène suffisamment dissociable pour être dosé directement par la potasse alcoolique en présence de phénolphtaléine. Nous opérons en solution dans un mélange en parties égales d'alcool à 90° et de benzène. Le dosage de l'échantillon T132 indique une teneur de 35 % en trichlorophénol.

b) *Dosage spectrographique du phosphate d'isobutyle.*

Nous utilisons la raie d'absorption très intense de la liaison à 1025 cm^{-1} où le trichlorophénol n'absorbe pas. Cette raie est étalonnée au moyen de deux solutions de phosphate triisobutylique pur à 0,996 % et 0,744 % dans le sulfure de carbone (fig. VII). Sur le même diagramme, nous avons enregistré le spectre du solvant et celui d'une solution à 1,502 % de l'échantillon T132 dans le même solvant.

La comparaison des intensités des raies d'absorption permet de calculer la teneur en phosphate triisobutylique qui est de 51 $\pm$ 2 % dans cet échantillon.

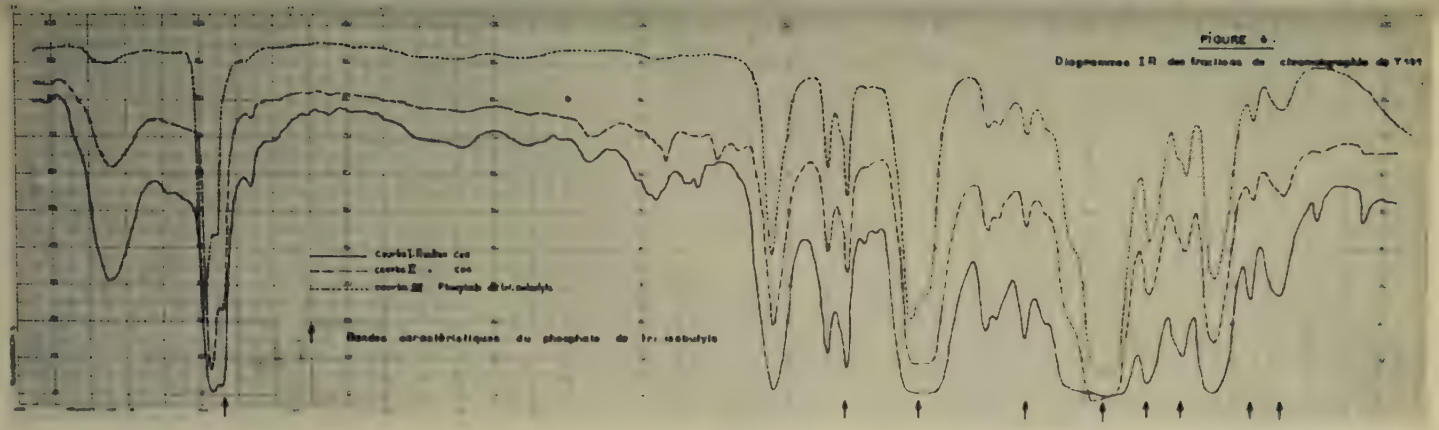


FIG. VI.

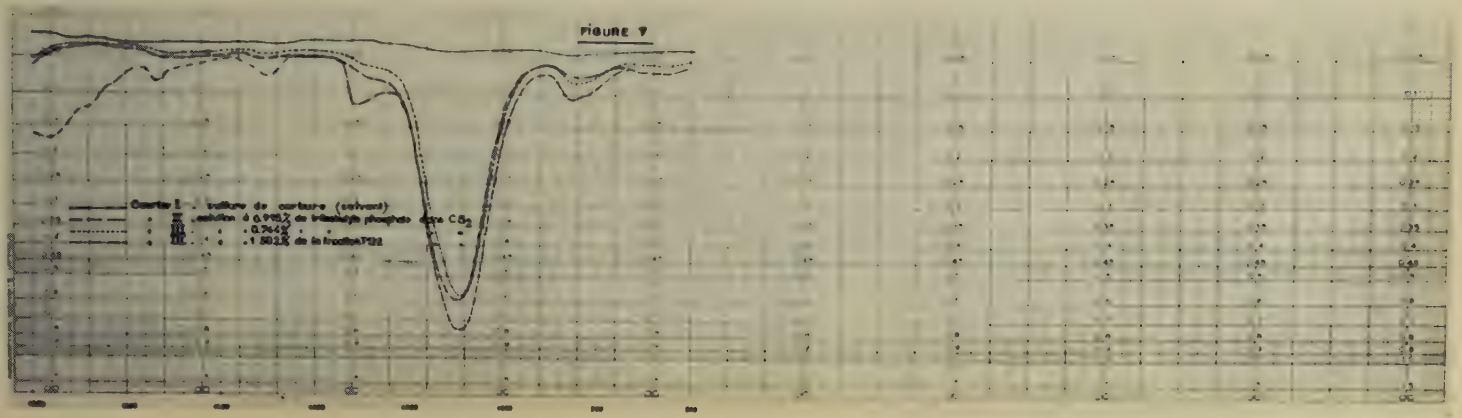


FIG. VII.

Le trichlorophénol (M = 197,5 — 35 %) et le phosphate triisobutylique (M = 266 — 51 %) entrent en proportions sensiblement équimoléculaires dans la composition du Trichlorex. Nous allons étudier les propriétés d'un tel mélange reconstitué à partir de produits purs.

IV. Trichlorex reconstitué.

On a reconstitué un mélange équimoléculaire de 2-4-5 trichlorophénol et de phosphate triisobutylique dont on a examiné la structure physique et les propriétés biologiques.

1. *Préparation des produits.*

a) *2-4-5 trichlorophénol.*

Le 2-4-5 trichlorophénol est préparé par action de la soude sur le 1-2-4-5 tétrachlorobenzène.

La réaction a lieu au reflux, en solution dans l'éthylèneglycol. Le tétrachlorobenzène est préalablement purifié par cristallisation dans l'alcool absolu (Tf = 138 — 141°C). Après réaction, le phénol brut précipité par acidification est purifié par cristallisation dans le pentane.

b) *Phosphate triisobutylique.*

Le phosphate triisobutylique est obtenu en faisant réagir l'oxychlorure de phosphore sur l'alcool isobutylique sec, en présence de pyridine :

$$3C_4H_9OH + POCl_3 + 3C_5H_5N \longrightarrow OP(OC_4H_9)_3 + 3C_5H_5N,\ HCl.$$

L'alcool isobutylique est préalablement séché et rectifié à 107°C.

Le phosphate obtenu est purifié par distillation sous 25 mm de Hg entre 152 et 156°C.

c) *Mélange équimoléculaire de 2-4-5 trichlorophénol et de phosphate triisobutylique.*

Le mélange équimoléculaire (TS) contient :

— 42,6 % de 2-4-5 trichlorophénol (M = 197,5).

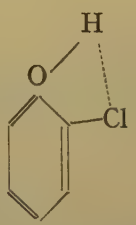
— 57,4 % de phosphate triisobutylique (M = 266).

Le mélange forme une solution limpide, légèrement visqueuse ayant pour indice de réfraction : $n_D^{20} = 1{,}4781$.

Distillé sous 0,2 mm de Hg ce produit donne une seule fraction à 112-114°C.

2. *Spectrographie infrarouge.*

Le spectre d'absorption dans l'infrarouge du mélange TS (fig. VIII) correspond exactement à celui de la fraction T132 extraite du 2-4-5 T. En particulier, on a retrouvé les deux bandes à 3.100 et 1.240 cm^{-1} qui n'appartiennent ni au 2-4-5 trichlorophénol, ni au phosphate triisobutylique et dont nous recherchions l'origine. Ces bandes ne sont donc pas dues à une troisième substance, mais caractérisent simplement des liaisons nouvelles qui se forment entre les deux corps. La bande à 3.100 cm^{-1} (3,2 μ) en particulier *correspond à une liaison hydrogène entre l'hydroxyle du phénol* et le *groupement phosphoryle du phosphate.* Cette liaison remplace le chélate qui existe entre l'oxhydryle et le chlore voisin d'un α-chlorophénol :



et qui dans le spectre du 2-4-5 trichlorophénol (fig. V) donnait une bande d'absorption à 3.500 cm^{-1} (2,85 μ). De même dans l'infrarouge lointain, la nouvelle bande qui apparaît à 1.240 cm^{-1}

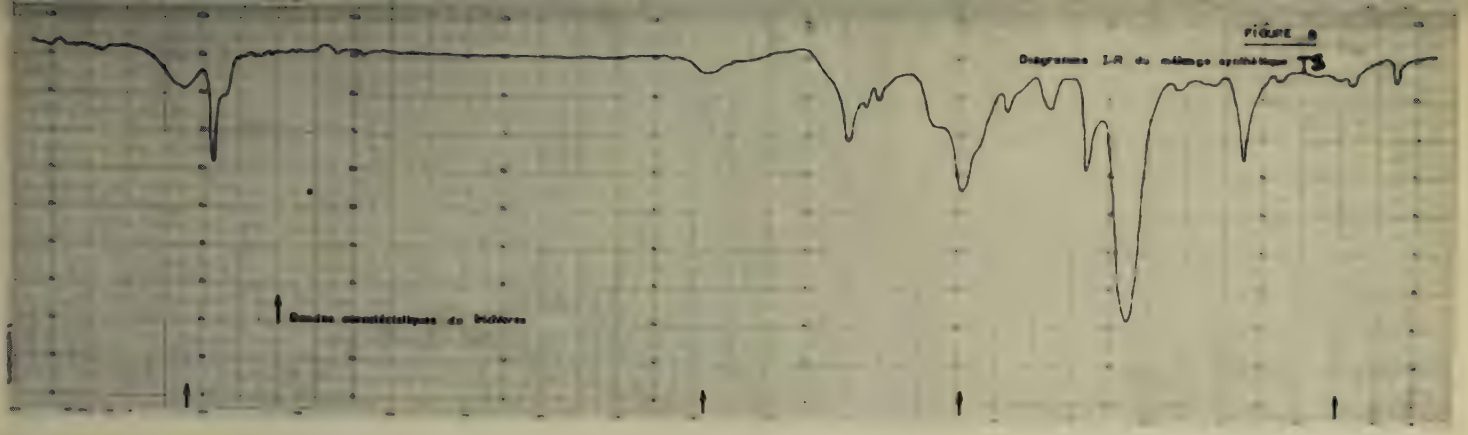


Fig. VIII.

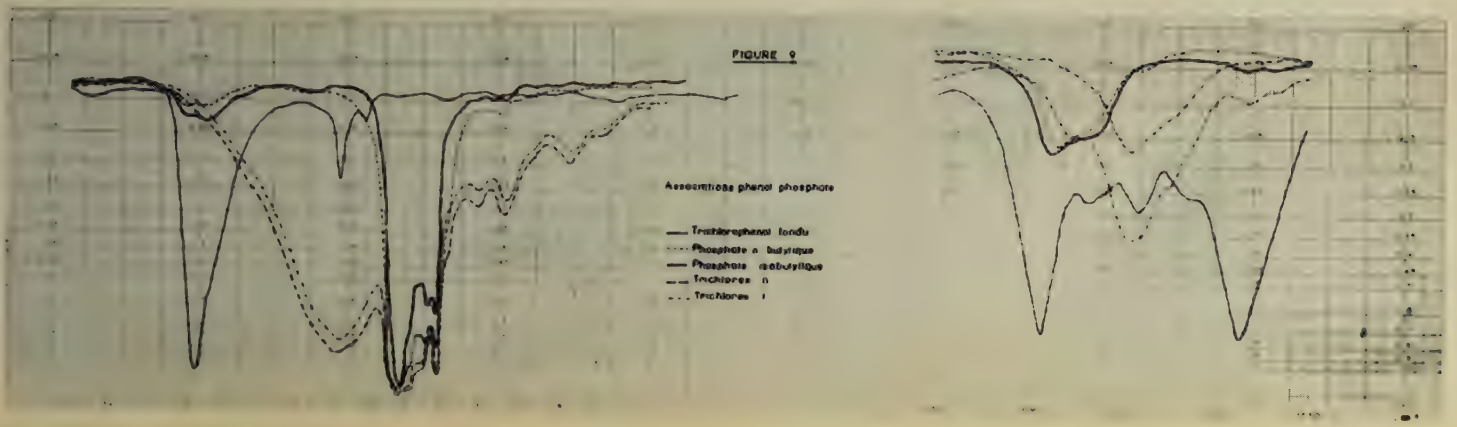
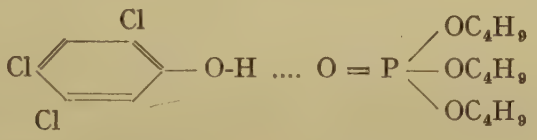


Fig. IX.

remplace celle qui, à 1.290 cm^{-1} correspondait à la liaison P = O du phosphate triisobutylique (fig. 6).

Le constituant actif du Trichlorex n'est donc pas un simple mélange de 2-4-5 trichlorophénol et de phosphate triisobutylique mais une *véritable association* de ces deux substances dont les molécules sont unies par une liaison hydrogène et que l'on peut représenter par le symbole :



D'autres accepteurs, tels que le phosphate butylique normal forment avec le trichlorophénol des associations analogues avec apparition d'une liaison hydrogène (fig. IX).

L'existence de cette association est confirmée d'une part, par l'étude des produits d'hydrolyse du Trichlorex, et d'autre part, par l'examen des activités biologiques des mélanges de 2-4-5 trichlorophénol et de phosphates tributyliques.

3. *Hydrolyse du Trichlorex.*

Une solution de Trichlorex dans l'éther sulfurique est agitée dans un entonnoir à décantation avec une solution aqueuse de NaOH à 10 % (cette dernière doit dissoudre les phénols sous forme de phénates). La phase aqueuse est séparée, réacidifiée par HCl et extraite à nouveau par l'éther sulfurique qui doit dissoudre les phénols. L'extrait éthéré est déshydraté avant distillation.

Deux échantillons de Trichlorex ont été traités comme ci-dessus et examinés comparativement en ce qui concerne leur toxicité sur les cultures habituelles.

On trouvera dans le tableau IX ces deux opérations d'hydrolyse.

TABLEAU IX.

N° des échantillons et limite d'activité	Poids de matière au départ g	Portion soluble dans NaOH cristaux P. F. 50-55°	Portion insoluble dans NaOH huile
310			
Trichlorex brut non distillé	1,279	258 mg (31_2)	991 mg (32_1)
Limite d'activité voisine de 1 /20.000		Limite d'activité voisine de 1 /60.000	Activité 0
		20,17 %	77,53 %
320			
Trichlorex distillé entre 50 et 70° sous vide	0,400	130 mg (32_2)	223 mg (32_1)
Activité voisine de 1 /100.000		Limite d'activité voisine de 1 /150.000	Activité 0
		37 %	63 %

La partie soluble dans NaOH (20 à 37 % du produit total) forme des cristaux fusibles à 50-55°C ; elle est active et sa toxicité antifongique se manifeste clairement jusqu'aux dilutions entre 1 /60.000 et 1 /150.000. Son point de fusion et son activité biologique permettent de l'assimiler au 2-4-5 trichlorophénol.

La partie insoluble dans NaOH est une huile inactive ; elle représente de 67 à 77 % du produit total. C'est le phosphate triisobutylique. Il constituait l'huile inactive isolée dans les essais de chromatographie relatés p. 927.

4. *Activités biologiques des associations phénol /phosphates.*

L'activité biologique du Trichlorex (Tableau X) est sensiblement la même lorsque le 2-4-5 trichlorophénol est associé soit au phosphate triisobutylique (Trichlorex *i*), soit au phosphate tributylique normal (Trichlorex *n*).

TABLEAU X. — Activités biologiques des associations de 2-4-5 trichlorophénols et de phosphates tributyliques.

Date de l'expérience	Nature du fongicide	Limites de toxicité sur	
		Candida albicans	Trichophyton interdigitale
Juillet 1959	Trichlorex i	> 1 /70.000 < 1 /75.000	> 1 /120.000 < 1 /125.000
»	Trichlorex n	> 1 /80.000 < 1 /90.000	> 1 /150.000
Octobre 1959	Trichlorex i	> 1 /70.000 < 1 /80.000	> 1 /140.000 < 1 /160.000
»	Trichlorex n	> 1 /70.000 < 1 /80.000	> 1 /140.000 < 1 /160.000
Décembre 1959	Trichlorex i	> 1 /50.000 < 1 /60.000	> 1 /100.000 < 1 /120.000
»	Trichlorex n	> 1 /50.000 < 1 /60.000	> 1 /100.000

Dans les exemples ci-dessus, le phénol était associé au phosphate en proportions sensiblement équimoléculaires. Nous avons également réalisé des mélanges à différentes teneurs en 2-4-5 trichlorophénol et phosphate triisobutylique.

Leurs activités biologiques sont indiquées dans le tableau XI :

On voit que la limite de toxicité dépend de la concentration du trichlorophénol dans le mélange.

Le phosphate lui-même est peu actif sur les cellules ; il faut des concentrations très élevées de ce produit à l'état pur (de l'ordre de 1 /4.000), pour inhiber la croissance de *Trichophyton interdigitale* et plus de 1 /1.000 pour *Candida albicans*. Ce fait n'est pas à négliger.

Le phosphate triisobutylique n'agit pas comme simple diluant : il augmente dans certains cas l'activité du trichlorophénol ; nous ne croyons pas cependant qu'il s'agisse ici d'une syner-

TABLEAU XI. — Influence de la teneur en trichlorophénol sur l'activité biologique.

Échantillon n°	Composition		Limite de toxicité sur	
	2-4-5 trichlorophénol	Phosphate triisobutylique	Candida albicans	Trichophyton interdigitale
TS 20	20	80	> 1/20 .000 < 1/40 .000	> 1/40 .000 < 1/80 .000
TS 40	40	60	> 1/40 .000 < 1/80 .000	> 1/150.000 < 1/200.000
TS 60	60	40	> 1/80 .000 < 1/100.000	> 1/200.000 < 1/250.000
TS 70	70	30	> 1/100.000 < 1/125.000	»
TS 80	80	20	> 1/100.000 < 1/150.000	»
TS 90	90	10	»	> 1/200.000
Trichlorophénol pur			> 1/140.000 < 1/150.000	> 1/200.000 < 1/300.000

gie vraie ; il est plus probable que le trichlorophénol incorporé au complexant constitue un ensemble doué de propriétés biologiques particulières, touchant par exemple aux phénomènes de perméabilité cellulaire.

Mais le point remarquable, sur lequel il importe d'attirer l'attention, c'est que la liaison hydrogène phosphate-trichlorophénol n'a pas altéré, dans le sens d'une diminution, la toxicité du 2-4-5 trichlorophénol vis-à-vis des Mycètes, Champignons inférieurs et de certains microorganismes comme *Candida albicans*, particulièrement résistants aux désinfectants ordinaires ou aux antibiotiques.

Dans la figure X, nous reproduisons en un diagramme bloc les limites de toxicité, vis-à-vis de *Candida albicans*, d'un certain nombre de phénols chlorés et dérivés qui ont été synthétisés au cours de cette étude.

On voit que le 2-4-5 trichlorophénol est de loin le corps le plus

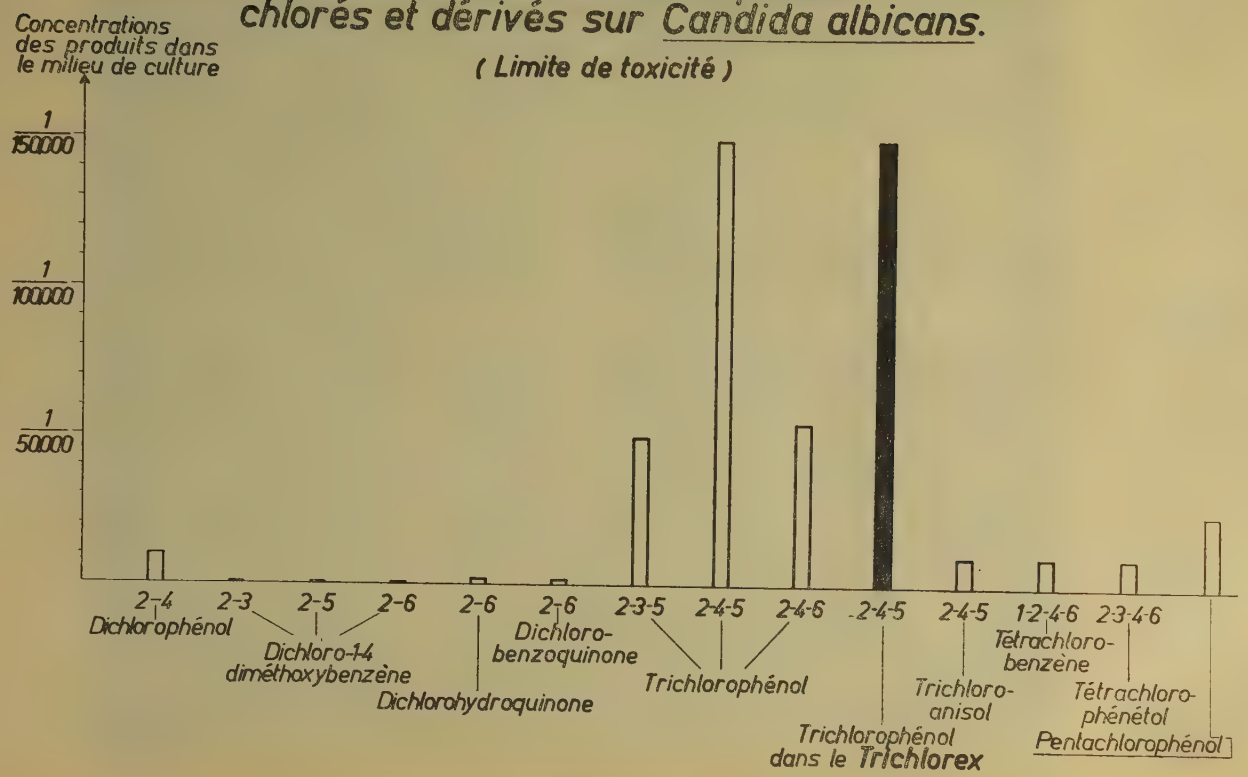

Activités de différents phénols chlorés et dérivés sur Candida albicans.
(Limite de toxicité)
Concentrations des produits dans le milieu de culture
1/150000
1/100000
1/50000
2-4 Dichlorophénol
2-3
2-5 Dichloro-1-4 diméthoxybenzène
2-6
2-6 Dichlorohydroquinone
2-6
2-6 Dichloro-benzoquinone
2-3-5
2-4-5 Trichlorophénol
2-4-6
2-4-5 Trichlorophénol dans le Trichlorex
2-4-5 Trichloro-anisol
1-2-4-6 Tétrachloro-benzène
2-3-4-6 Tétrachloro-phénétol
Pentachlorophénol

Fig. X.

toxique, qu'il soit ou non incorporé au Trichlorex. On voit aussi que la fixation d'un groupe méthoxy ou éthoxy sur un phénol chloré comme le trichloroanisol diminue, par contre, la toxicité.

V. Toxicité du Trichlorex vis-a-vis des animaux supérieurs.

Le Trichlorex est un composé stable à faible tension de vapeur.

Depuis une dizaine d'années, il a été manipulé par divers travailleurs de nos laboratoires sans provoquer les phénomènes d'irritation, de lésions épidermiques et même d'intoxication généralisée que l'on a observés chez ceux qui sont en contact avec les phénols chlorés. Il ne présente donc aucun des inconvénients majeurs de ces corps.

Il est, par conséquent, logique de songer à la possibilité d'une très large utilisation du Trichlorex et notamment en médecine humaine et vétérinaire. La fig. XI reproduit la réaction au Trichlorex de quelques champignons dermatophytes et de deux *Candida*.

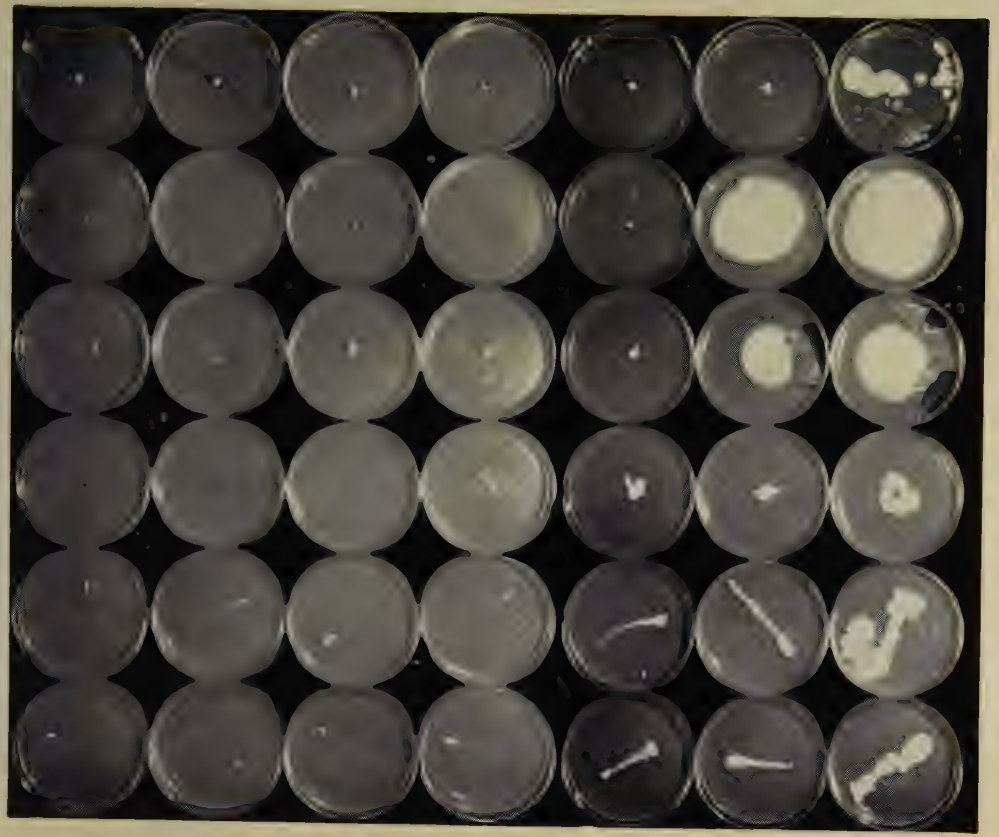
La sensibilité des *Candida* au Trichlorex permettra de mettre au point des traitements capables de lutter contre les candidoses si nombreuses aujourd'hui, à la suite de l'emploi des antibiotiques (Rimbaud 1960, voir liste bibliographique, note I).

Il conviendra donc d'envisager sa toxicité vis-à-vis des animaux.

Des recherches approfondies sont en cours dans plusieurs Instituts Médicaux ; cependant les essais préliminaires ont déjà donné des résultats encourageants : des quantités relativement importantes de Trichlorex ont pu être injectées à des cobayes sans amener de troubles repérables.

Des essais comparatifs de toxicité du Trichlorex et de ses constituants seront effectués sur divers organismes supérieurs. La conclusion cependant peut déjà se formuler : les animaux supérieurs ne sont pas affectés par les *doses efficientes* dans nos essais de toxicité, sur organismes inférieurs.

1/10.000 1/20.000 1/40.000 1/60.000 1/80.000 1/100.000 Témoin



Trichophyton gypseum granulosum

Scopulariopsis brevicaulis

Trichophyton interdigitale

Trichosporon cutaneum

Candida parapsilosis

Candida albicans

FIG. XI. — Action de Trichlores en diverses concentrations sur la croissance d'organismes végétaux cultivés sur milieu de Sabouraud au *p*H 7. Ph. : R. SAUVEUR.

VI. Conclusions.

1) Le Trichlorex, extrait du 2-4-5 trichlorophénoxyacétate de sodium brut, est une association équimoléculaire de 2-4-5 trichlorophénol et de phosphate triisobutylique.

2) Il possède les propriétés toxiques du trichlorophénol (2-4-5) sur organismes inférieurs et l'association avec le complexant ne les altère pas.

3) Les propriétés fongicides et bactéricides du trichlorophénol sont connues ; mais cette substance n'est pas utilisée à des fins thérapeutiques en raison des lésions qu'elle provoque chez ceux qui la manipulent.

4) Par contre, le Trichlorex soit à l'état brut tel qu'il est extrait du 2-4-5 T, soit reconstitué à partir de produits purs, est un composé remarquablement stable qui peut être employé sans inconvénient, ni danger. Il peut être appliqué directement sur l'épiderme.

5) La disparition des propriétés irritantes du 2-4-5 trichlorophénol lorsqu'il est associé au phosphate d'isobutyle, correspond sur le plan physico-chimique à la formation d'une liaison hydrogène intermoléculaire remplaçant le chélate interne du phénol.

Nous considérons cette dernière conclusion comme intéressante au point de vue théorique car elle propose d'associer des propriétés biologiques particulières non plus uniquement à une architecture moléculaire, mais à une image stéréochimique possédant une configuration électronique définie plus ou moins stable.

* * *

Dans de prochaines communications, nous étudierons les propriétés biologiques du Trichlorex.

ACADÉMIE ROYALE DE BELGIQUE

CLASSE DES SCIENCES

MÉMOIRES

Collection in-8°. Deuxième série.

TOME XXXIII, fasc. 1.

KONINKLIJKE ACADEMIE VAN BELGIË

KLASSE DER WETENSCHAPPEN

VERHANDELINGEN

Verzameling in-8°. Tweede reeks.

BOEK XXXIII, afl. 1.

BRUXELLES
PALAIS DES ACADÉMIES
RUE DUCALE, 1

BRUSSEL
PALEIS DER ACADEMIËN
HERTOGSSTRAAT, 1

1961

IMPRIMERIE J. DUCULOT

S. A.

GEMBLOUX.

Morphological and metabolic changes in the apical bud with relation to photoperiodism in SALVIA SPLENDENS

Changements morphologiques et métaboliques dans le bourgeon apical en relation avec le photopériodisme chez *Salvia Splendens*

BY

R. M. M. CRAWFORD,

Research Scholarship of Carnegie Trust for Scotland
Dr in Botany, University of Liège

Plant Physiology Laboratorium, Prof. R. Bouillenne.

Impression décidée le 10 juin 1961

INDEX

Introduction 7
Historical Review 9

Photoperiodism 9
The development of the stem meristem with flower induction 15
The effect of temperature on flowering 20
The physiology of flowering 22
Theories of flower induction 34

The plant material and its cultivation in the Phytotron 39

PART I.

The development and autoecology of Salvia splendens 42

The effect of day length on flowering 42
The effect of the interuption of the night on flowering 58
The effect of temperature on growth and flowering..... 62
General conclusions on photoperiodism 70

PART II.

The anatomy and morphology of the apical bud 72

Findings and conclusions of Parts I and II 80

PART III.

The respiration of the excised apical buds in relation to photoperiodism 84

Methods 84
The respiratory activities of the buds in the course of development of the plants in 8 and 16 hour days 94
The effect of the interruption of the night on the respiration of the excised buds 103
Findings and conclusions of Part III 107

General Discussion 109

Summary 114
Résumé 115
Acknowledgments 117
Bibliography 117

INTRODUCTION.

One of the most outstanding features which determines the survival and success of species of plant or animal is the timing of the events in its life cycle. These events usually follow a regular pattern from year to year that is often characteristic for each species. One of the most striking of these periodicities is the seasonal production of flowers. It is only in the last half-century however that these periodicities have been investigated. Photo and thermoperiodicities are the subjects that have received the most attention.

As a result of these researches, it is now known in fair detail to what light and dark periods and to what temperature fluctuations different plants will react. Obligatory waiting and dormancy periods have been found in many plants as well as the means for removing or breaking these dormancies.

The problem of how these different periodic stimuli alter the plant's metabolism remains largely a mystery.

In this thesis a comparative biochemical study is made of the reactions of a plant to such a stimulus. Young developing tissue is taken and its metabolism is investigated before and after the action of a light stimulus which will subsequently alter the mode of development of the entire plant. By using different photoperiods in a controlled environment initially similar plants can be made to behave in entirely different ways both regarding growth and flowering.

The terminal bud has been taken as the region for comparison as it is the site of the differentiation into the flowering state.

The problem required several separate but simultaneous lines of investigation. To begin with, a plant had to be found with monopodial growth and a suitable bud for excision. Monopodial growth simplified the experiments on the ageing of the buds. Such a plant was found in *Salvia splendens*, Sello, var. Feu de la Saint Jean, from a suggestion of Prof. R. Bouillenne. The photoperiodic reaction of the plant had then to be determined with regard to the controlled conditions of the experiments in the

Phytotron of the University of Liège (*). This was pursued a stage further in order to investigate systematically the interaction of ecological factors on the photoperiodic reaction. The anatomy and developmental morphology of the buds and young leaves had to be investigated with regard to the different conditions and stages of growth in order that the morphological response to the flowering stimulus could be accurately timed.

Knowing these preliminaries, the means were then available to make a comparative biochemical study of the young buds in relation to their morphogenesis into the flowering or non-flowering state.

(*) Travail subsidié par l'Institut de Recherches pour l'Industrie et l'agriculture en Belgique (I. R. S. I. A.).

HISTORICAL REVIEW OF PHOTOPERIODISM AND THE PHYSIOLOGY OF FLOWERING.

Photoperiodism.

Garner and Allard (1920) were the first workers to classify plants according to their flowering behaviour when grown in days of different lengths. These authors transferred plants from one day length to another in order to investigate the mechanism of flower induction as controlled by the day length. By taking tobacco plants from the northern parts of the U.S.A. and transferring them to the south and vice-versa, they were able to make the following distinctions which were soon shown to hold for many other plants. (Garner and Allard 1923.)

1. Long day plants : plants requiring long days and short nights in order to reach the flowering condition.

2. Short day plants : plants requiring short days and long nights for flowering.

3. Day neutral plants : plants that were indifferent to day length in their ability to initiate flowers.

For the plants investigated by these workers the above differences proved to be absolute. This was clearly shown with a selection of short day plants which were kept in long days for up to 8 years and failed to lose their vegetative condition. (Garner and Allard 1931).

Although these authors were the first to classify the flowering reaction of plants according to day length on an absolute basis, they were not the first to demonstrate the effect of day length on flowering. Darwin (1868) had already anticipated the north-south transfer experiments of Garner and Allard with tobacco in his observation on the ripening of grain in maize. Darwin noted in 1868 in his book on «« The Variation of Animals and Plants under Domestication »», that when strains of maize

grown in the north were transplanted to the south and vice-versa, then difficulty was frequently encountered in the proper ripening of the cobs. Diels (1906) investigated the flowering of several Indian rose species under various conditions of cultivation and found that where the plants were growing under difficulties, including short days, then they would flower prematurely while still tiny seedlings with a few primitive leaves. Such precocious flowering is now called pedogenesis. Much interest was taken in this subject at that time and several works were published on day length and flowering in hops. (Tournois 1911, Figdor 1911). Tournois found that hops sown in Paris in February would flower straight away while still dwarf plants, whereas if samples of the same seed were sown in April normal plants were produced which did not flower for several months, having first obtained a height of three to four feet. Tournois (1914) was subsequently able to show that if the day length was of 6 hours in length or less, then podocarpy would result. Cultivation of the plants in long days never gave rise to precocious flowering. These experiments only showed that rapid flowering was favoured under certain day lengths. They did not show the absolute distinction as found by Garner and Allard, nor did they classify any plants as to their preference for flowering in long or short days. But it was Tournois who first succeded to point out the reality of the day lenght action.

Since these early experiments the facts of photoperiodism have been greatly extended. It was found that the effect of day length on flower induction would be modified by changing the duration of the night. This was shown by experiments in which the night was interrupted by short periods of light. Fabian (1938) discovered that the interruption of the night by a very small quantity of light (0,5 lux,) was sufficient to prevent flowering in short day plants. Hamner (1940) found that a flash from a light of high intensity in the middle of the night would also prevent flowering in short day plants. At the same time and presumably independantly, for it was during the second World War, German workers obtained the same results. Harder and Bode (1943) found that a light break of intensity of 20 lux and lasting only one minute was sufficient to hinder flower induction in Kalanchœ. They also went further to show that this interruption of the night was dependent, for its success in preventing

flowering, on the length of the preceding dark period, the age the plant and the length and intensity of the interrupting light. They showed also that other aspects of the plant's metabolism which were found to be different in plants grown in long and short days would also react to the light break. The succulence of the leaves, for example, fell with the light break treatment as in long days.

By 1948 this new approach to photoperiodism in which it was the night length that was shown to be of overriding importance and not the day length had led to the following definitions of photoperiodism being widely accepted.

1. Long day plants : plants which require short dark periods to accelerate flowering.

2. Short day plants : plants which require dark periods of minimum duration for flowering (From Hamner, see Murneek 1948).

It will be noted in these definitions that the absoluteness of the original definitions of Garner and Allard have been abandoned. In earlier works plants were commonly described that had an all or nothing effect in their relation to photoperiodic induction (Lang and Melchers 1943). Later in a review on plant flowering in 1952 Lang considers plants that have a purely quantitative reaction to day length as regards flower induction. In *Xanthium spinosum* flowering is accelerated by increasing day length on a proportional basis. With *Xanthium strumarium* increasing day length only accelerates flowering up to a certain limit. This absence of critical day lengths which is found with many plants caused Lang to adopt definitions of photoperiodism very similar to those quoted above from Hamner.

The classification of plants even on a basis of quantitative response to day length has also become more complicated. As well as the three basic classes of short day, long day and neutral day plants, examples are now known of plants such as *Saccharum spontaneum* (Bünning 1953) which will flower only in days where the light length is between 12 and 14 hours. The converse is also known. *Madia elegans* will produce flowers in days of 8 hours or of more than 14 hours, but will not flower where the day length is 12 hours (Bünning 1953).

Recently the class of short day plants has been further divided nito two groups by Resende (1952). This author distinguishes the

short day plants proper, where only short days are required to induce flowering, and the long short day plants. The latter must have long days followed by short days in order to produce flowers. Without this pretreatment in long days, the short days are insufficient to induce flowering. R. Sachs (1956) has shown that *Cestrum nocturnum* is such a plant. One long day followed by three short days were found to be necessary for flowering. This plant differs from the normal long day plants in that a 16 hour day was found to be superior to a 24 hour day in inducing the plant to flower, the contrary to long day plants where it is usually found that a 24 hour day is as good as or even better than a long day with a short night in inducing flowering (Hamner 1940).

At the same time as the question of the reaction of plants to day length was being defined, the part of the plant which acts as the receptive organ for this stimulus was also found. Garner and Allard had already shown (1923) that it was the leaves that were sensitive to the photoperiodic stimulus. This question was carried further by studies on the effect of plant age on the photoperiodic reaction. Cajlachan (1933) found that the greatest stimulation of flowering was abtained from the photoperiodic reaction when his plants (millet-*Sorghum vulgare*) were between the lst and 15th weeks of their growth, that is when the plants were growing most actively. Borthwick and Parker (1938) found however that with soya beans that the older the plants the more sensitive they were to the photoperiodic stimulus. Later this question was more precisely dealt with by Khudairi and Hamner (1954) in investigations on the sensitivity of leaves of different ages to the flowering stimulus. They found the half expanding leaf to be the most receptive.

This localisation of the reception of the stimulus was confirmed by Knott (1934) using spinach. *(Spinacia oleracea)*.

Harder and von Witsch (1941) working with Kalanchœ showed that induction of one leaf on one branch of the plant could induce flowering in another branch provided that all the leaves were removed from the latter branch. The necessity for the removal of leaves will be further discussed in the section on theories of flowering.

That the leaves synthesised a product that had to be translocated to the meristem to produce flowering in the plant was already ancient idea that had been mentioned by J. Sachs in 1887.

However, these modern demonstrations of the truth of this idea caused considerable use to be made of grafting on the study of the inter-relation between the reception of the stimulus by the leaf and its eventual action on the development of the meristem. Melchers and Lang (1941) showed that the grafting of an induced leaf on to a plant that has not received any flower inducing treatment will induce flowering in this plant even in the presence of this plant's non-induced leaves. The necessity of good tissue connections between the stock and the scion for the successful transfer of the flowering stimulus to the plant was shown by Heinze et al. (1942). Cajlachan carried the study further in demonstrating that the flowering stimulus was not species specific (1945). Plants of one species could be used as the source of scions for grafting on to vegetative stocks and flowering would be induced not only in another species of the same genus but successful grafts with induction of flowering could be accomplished between plants of different genera. Roberts (1949) pointed out that compatibility between a stock and any particular scion has, in general, little or no connection with the systematic relationship of the plants. Grafts between different strains of the same species are found just as frequently to be incompatible as grafts between different species, genera or families. This lack of specificity in grafting and in the transfer of the flowering stimulus was confirmed by Melchers and Lang (1948) who were able to graft Hyoscyamus on Nicotania and Petunia. They also found that the reciprocal graft of Petunia onto vegetative stocks was equally successful for the transfer of the flowering stimulus. Struckmeyer (1950) showed that a connection was necessary between the sieve tubes of the stock and scion before the flowering stimulus could be transmitted from one plant to the other. Habermann et al. (1958) showed that even when a piece of albino tissue was grafted between the contact of the scion and stock that the flowering stimulus was still successfully transferred to the vegetative plant. These workers using *Helianthus annuus* also carried out expriments using multiple grafts and still there was no hindrance to the transfer of flowering.

Lona (1949) showed that a shoot could still be photoperiodically induced after it had been detached from its parent plant provided that the shoot possessed an active bud. Such shoots after receiving a suitable photo-induction could then be grafted

on to a vegetative plant kept under non-flowering conditions and this plant would be induced to flower.

A very detailed investigation of grafting and flower formation was carried out by Zeevart in the Netherlands (1958). Using the ability of the leaves to induce flowering on another plant, he measured the sensitivity of leaves coming from different positions on the plant to the photoperiodic stimulus. Working with Perilla he found that sensitivity increased at least up to the 5th pair. If leaves had been exposed to flower induction on the parent plant for up to 30 days then on grafting they would induce flowering on the stock even if kept in the dark. Leaves thus directly induced on the parent plant could be regrafted many times and still induce flowering in the stock. In one experiment he was able to graft the same single leaf on to seven different stock plants and was able to induce flower formation in every one of them. Like Lona he found that induction of detached shoots was only successful if these shoots possessed an active bud. Leaves taken from these shoots could not be successfully regrafted so as to transmit the flowering stimulus. Zeevart also used sugars labelled with C^{14} and confirmed the work of Struckmeyer in that a physiological and anatomical connection was necessary between the sieve tubes of the stock and scion for successful flowering. He was also able to correlate the timing of this anatomical union with the first passage of foodstuffs out of the leaf. The grafted leaves were sprayed with glucose marked with C^{14} and the same time that was necessary for the formation of the union between the sieve tubes as seen with the microscope was required before the first signs of radioactivity could be detected in the meristem of the stock. If the leaves were removed before this time (usually 10 days after grafting) then no flower induction took place.

In connection with these man-made grafts, it is interesting to note in certain parasitic plants, Nature's grafts, that the flowering of the parasite is often dependent on the flowering of the host. Holdsworth and Nutman (1947) found that *Orobanche minor* which during its vegetative life shows no photoperiodic activation either in germination or on attachement to the host as at this stage the parasite lives only under the ground, will bloom only when the host Trifolium blooms. Trifolium as used in these experiments was a long day plant and when this host

with its parasite were kept in short days flowers were formed on neither. These authors also showed that with two species of Cuscuta, *(C. europea and C. gronovii,)* flowering was independent of day length and of the flowering of the host. These plants as they possess green leaves and produce their own photosynthetic requirements might thus be expected to show this amount of independence as regards other light reactions. Denferr (1950) did however show that *Cuscuta gronovii* would parasitise long day hosts more rapidly when they were growing in long days (Calendula) and short day hosts more rapidly in short days (Cosmos).

The development of the stem meristem with flower induction.

The essential effect of the flower inducing stimulus on the plant is to change the pattern of growth in the stem meristem. After having produced leaves the growing region of the stem alters its morphology and function and produces flowers. It is therefore logical that numerous authors have studied the growth and development of the meristem with regard to flowering. In order that this could be precisely investigated it is necessary to consider which tissues of the meristem respond the flower induction stimulus. Gregoire (1938) basing his interpretation of the meristem on the Tunica-Corpus theory of Schmidt (1924), considers the flowering tissue as something quite abnormal in the growth pattern of the tissues of the meristem. For this author floral meristem is a neoformation. Sterling (1946) adapts this point of view a little in considering the meristem as consisting of 4 principal regions, the initial group, the central mother cells, the eumeristem, the central mother cells and the rib meristem. This is largely the same type of division of the tissues as in the Tunica-Corpus theory. The divisions of Troll are just subdivisions of the corpus and tunica. Philipson (1947-48, 54), in a series of anatomical studies on the development of the inflorescence, disagrees with the views of Grégoire in regarding the floral meristem as a neoformation. He considers that the various parts of the inflorescence have their origins in definite parts of the vegetative meristem. A completely different interpretation of the meristem and its reaction to flower induction is given by Buvat (1952, 1955). Buvat divides the tunica into an initial

ring, which during the vegetative life of the plant produces leaves, and a sporogenous promeristem. The corpus is likewise divided into two regions, the receptacle promeristem and the medullary meristem. The sporogenous promeristem and the receptacle meristem are called the waiting meristem (méristème d'attente). It is this waiting meristem that produces the floral organs after flowering is initiated. Lance (1952) agrees with Buvat' s interpretation and advances the concept that the centre of the apex is quite inactive during vegetative growth. Gifford (1954) however effectively disputes the theory of Buvat using evidence obtained from periclinal chimaeras. He dœs agree however in that the flanks of the meristem are the most active portion of the meristem in cell division. Millington and Fisk (1956) in a study of the shoot development in Xanthium describe a single layered tunica with a corpus of non-homogeneous cells. The latter they divide into a central mother cell zone, with a transition zone beneath it and flanked by a zone of rib meristem. These workers do not completeley agree with the theory of Buvat as regards the relative inactivity of the central mother cell zone during the vegetative life of the plant. However they do consider the distinction of the rib meristem, the central mother cells and the transitional region as a better interpretation than the tunica-corpus theory. These authors note also that the size of the apex increases during the ontogeny of the plant, and that this is matched at the same time by an increasing size in the appendages produced. This is also found by Abbé et al. (1941).

Whatever the merits of the details of the various interpretations outlined above the overall picture remains that on the induction of flowering, the site of cell division instead of being largely or completely confined to the flanks of the apex moves into the centre of the meristem. This change in the activity of the apex is also seen cytochemically in the work of Buvat (1952). Here it was found that on staining the meristem sections by the Brachet method, Brachet (1946) in order to demonstrate the presence of ribonucleic acid (RNA), that the staining which was confined largely to the flanks of the apex during vegetative growth became much more evident in the central region of the apex flower induction.

The time scale has also been investigated regarding the moment of onset of differentiation in the meristematic region after

the subjection of the plant to the flower promoting stimulus. Popham et al. (1952) working with Chrysanthemum found that after passing to short days, that receptacle and floral initiation had begun after two periods. A similar rapid morphological change was found in Xanthium by Thein (1957). She found after three days a lengthening of the cells of the meristem. After 7 days the primordia could be seen and 14 days after the beginning of flower induction young flowers could be detected. Naylor (1941) found that given continuous flower induction then the first anatomical changes began to take place after 40 to 60 hours. This rate of change was slower when only one photoinductive cycle was given.

The question of the rate at which anatomical changes take place in response to the flowering stimulus leads to the question of the length of time over which the stimulus should be given, how much is required to initiate flowering, and whether once flowering has started will the plant return to the vegetative condition on the removal of the flowering stimulus ? Anatomical investigations of the type described above on the stem meristem have shown with Soya, Parker and Borthwick (1950) that when only 2 to 3 suitable photoperiods are given that only a few flower primordia are formed and that the plant returns to the vegetative condition. Parker et al. (1950) found that with Xanthium that if only one inductive period was given then there was an enlargement of the apex of the terminal meristem but that afterwards only leaves were formed. Struckmeyer (1941) working with *Salvia splendens* (var. Harbinger, a short day plant) found that bud abortion would occur unless photoperiodic induction was given over a longer period that was necessary for the formation of flower primordia. The flower primordia were visible after 9 days bud at least 17 were necessary to avoid abortion. It was also found that the cambium lost its activity after flower primordia were initiated. This cessation of growth by the stem would render grafting experiments on the flowering of Salvia theoretically impossible, (Roberts et al. 1939[b]). Roberts (1949) points out that for successful grafting the stem meristems must retain their activities in the stock and scion. In his 1939 paper, he also shows that these criteria would be difficult to fulfil with Salvia.

Observing the reaction of the plant as a whole, Tournois (1912) observed that hemp plants that had been brought to

flowering in long days would revert to the vegetative condition on being placed in short days. When the plants are made to flower by cultivating them first in short days, then on placing them in long days they will also cease to flower and produce instead abnormally large leaves (Cheuvart, 1954). This was a confirmation of similar results found by Petit (1952).

Chouard (1949) claims that with the short day plants of Xanthium the reversibility of flowering is impossible. However, with *Soya biloxi*, *Helianthum guttatum*, *Perilla nankinensis* and *Calluna vulgaris* the reversal of flowering and the return to the vegetative condition can be accomplished. Sironval (1951[b]) working with an ever flowering variety of strawberry found that flower induction was irreversible.

Much of the confusion that arises in this aspect of flower induction is due to the fact that it is very difficult to standardise the vegetative growth that has taken place before the photoperiodic induction is given to the plants. Various attempts have been made to show that the plant varies in its sensitivity to the various stimuli of the environment throughout its life cycle. The concept of various phases of development was first raised by Gassner (1918) in the sensitivity of young cereal plants with the subsequent hastening of their flowering, to a cold treatment during the first period of their development. This has become the basis of the process of vernalisation as applied to agriculture. Lyssenko (1927) Melchers (1950), working with Hyoscyamus, normally a plant that takes two years to flowers found that the plants will react sooner in their first year to the photoperiodic stimulus if the young plants are given a cold treatment. That bulbs have different optimal temperatures in their development throughout the year has been shown by Blaauw (1932) and Went (1948).

With regard to light, Harder and von Witsch (1942) showed that short days given to Kalanchœ plants did not induce flowering when given after germination, even if continued for 6 weeks. However, if the plants had an age of 4 months then flower initiation was relatively rapid. The underlying principle that no reaction can be expected to a stimulus if the plant has not developed organs at the state or the number of them at which it becomes able to respond to the stimulus in question is emphasised by Bouillenne (1955). In 1934 Purvis had stated the concept of

minimal leaf number with regard to flowering in rye and wheat. Purvis showed that for these cereals a certain number of leaves, precise in number for each type of plant has to be produced before flowers will be formed. In any case this number could never be less than the number of leaves present in the seed embryo. This idea of a photophase during which the plant reacts to the photoperiod led Purvis and Gregory (1937) to standardise the amount of proceeding vegetative growth in their photoperiodism experiments.

The insensitivity of young plants of *Cannabis sativa* to day length immediately after germination was shown by Petit (1952). Although the young plants of the various species cited above often show insensitive periods to day length as far as flower induction is concerned, it appears that they are not completely insensitive, as vegetative features are found to change with day length, (Harder and Springorum, 1947). Working with Begonia, Sironval (1951) found that the plant was never indifferent to day length but that its reaction varied throughout its life.

Jennings and Zuck (1954) found that the cotyledons of Xanthium were incapable of inducing flowering in response to the photoperiodic stimulus either directly while growing on the plant or indirectly in grafting experiments. These experiments were all carried out while the plants were still very young, and often before any other leaves other than the cotyledons had been produced. These authors concluded that in view of the high sensitivity of Xanthium to day length it seemed unlikely that any other plant could be induced to flower by use of the cotyledons alone. However, Zieracks (1952) had already shown that using a selection of annual plants flowering could be induced using only the cotyledons and primordial leaves, provided the plants were allowed to age and the other leaves which would normally develop were cut off as soon as they began to grow. Bouillenne (personal communication) has also shown that tomatoes may be induced to flower with only their cotyledons as leaves by the same method of letting the plants age and removing the developing leaves.

It appears therefore that a certain stage in morphogenesis has to be reached before the plant is capable of reacting to the photoperiodic stimulus by flowering although it may respond in other ways. The phases of development of the strawberry as

seen by the changes in form of the leaves produced throughout the course of the development of the plant was stressed by Sironval (1952). Bouillenne had already pointed out in 1927 and 1928 the importance and usefulness of morphological changes as a sensitive indication of some physiological change that may be too slight to be measured by other means. Further examples of this are given by Bouillenne et al. (1940) with regard to the vegetative cycles in the development of sugar beet.

The effect of temperature on flowering.

That the sensitivity of the plant to the photoperiodic stimulus is not independent of temperature has been known for many years. One of the earliest attempts to determine the part of the plant that was sensitive to temperature changes was made by Curtis and Chang (1930). They found that chilling the meristem of the plant by means of a water pipe cooler had a greater effect in modifying the reaction to the flowering stimulus than cooling the whole plant. The apex was also shown in Schwabe (1954) to be the site of the perception of the vernalisation stimulus. These last two works both dealt with flowering being promoted through cold treatment.

Working in the opposite sense, Parker and Borthwick (1943) found that the inhibitory effect of low temperature on the flowering of Biloxi soya beans appeared to result from the temperature of the leaf blade during the dark period. They were led to this by earlier experiments (Borthwick et al. 1941), in which they found that localised cold treatments of the terminal buds and petioles at 3° C. would be sufficient to prevent flowering. Cooling to 10° C. was only partially successful in preventing flowering. They interpreted both sets of experiments as evidence of the hindrance of the translocation of the flowering stimulus out of the leaves to the terminal buds.

Cases are known where temperature treatments can take the place of the light stimulus in plants that are normally thought of as being induced to flower by a photoperiodic stimulus. Roberts and Struckmeyer (1938) found that *Salvia splendens*, (var. Harbinger) required short cool days for flower induction but warm short days for the development of the flowering bud. The same authors (1939) working with the same plant (Salvia)

found that at 21° to 24° C. that the plant flowered in short days but not in long. This behaviour did not change at 17° to 18° C. but at 12° C. the plant flowered equally well in long and short days. They concluded that at 12° C. the flowering in long days was induced by temperature and in short days by the photoperiodic stimulus. Similar results were obtained for the same effect but on a more quantitative basis by Lang and Melchers (1943). They found with Hyoscyamus that the critical day length decreased from 11,5 to 8,5 hours as the temperature decreased from 28 to 15° C. Koningsberger (1954) found that Poinsettia, a short day plant at low temperature, was indifferent to day length in its ability to flower at high temperatures. He also found that the sensitivity of strawberries to supplementary illumination decreased on lowering the temperature. In the more complicated case of the long short day plant *Cestrum nocturnum* (Sachs 1956[b]), it was found that the temperature during the light period had the greatest effect on the long day induction and that the nyctotemperature was the most influential with the short day induction.

Futher examples for the substitution of temperature effect for light are cited by Murneek (1940). In investigating the flowering on Rudbeckia, it was found that high temperature may substitute for long days in inducing flowering in *R. bicolor* one of the southern species of the genus, but not in *R. speciosa* which is a northern species, where stem elongation was not fostered by short days and high temperatures (32° C.) Both these species are long day plants.

The precise requirement of some plants for certain conditions of day length and temperature can in some instances be used to explain why these plants are found rarely in flower in their wild conditions. *Lemna gibba* although seldom seen in flower in nature can be induced to flower in the laborotory by day lengths of between 12 and 14 hours with temperatures kept at 30° C., (Kandler R. 1955).

As with responses to light stimuli, the reaction of the plant to temperature conditions varies with its stage of development. The work of Blaauw (1932) and F. Went (1948) has already been mentioned in connection with bulb development. Schwabe (1950) working with Chrysanthemum found that low temperatures hasten the initiation of the inflorescence buds and in the

absence of such a vernalisation treatment growth was diageotropic and vegetative. For the opening of the buds, however, it was day length that was the important factor. In studies on the onion plant Holdsworth and Heath (1950) found that temperature above 17° C. inhibit inflorescence initiation in growing plants and in stored sets, whether in long or short days. When the plants are sufficiently large, flower initiation takes place on the temperature falling below 15° C. Small plants were always found to be incapable of producing an inflorescence. It is sometimes possible to apply the temperature and light treatments independently of one another. Gardner and Loomis (1953) working with *Dactilis glomerata* found that the short days and cold treatment which are both necessary for flowering could be applied separately to the plants. The stimulus in this case was local. The non-induced axillary shoots of the induced stem did not flower. Long days were eventually required for the flower primordia to develop.

The effect of temperature fluctuations throughout the 24 diurnal cycle has been reviewed by Went (1953). In many instances these alternations of day and night temperatures can have a profound effect on the general metabolism of the plant. Monselise et al. (1958) working on the growth of peas found that stem elongation was greatest with high day temperatures. Differences were also obtained on the rate of dry matter accumulation. Troupin (1946) has also found thermoperiodic effects in the growth of *Mercurialis annua*.

The physiology of flowering.

Having considered the reaction of the plants to day length and the factors which may modify these reactions, it is now necessary to consider the changes that are produced in the plant's metabolism by the photoperiodic stimulus.

One of the first observations that suggested that the phyphysiology of flowering plants was different from that of vegetative plants was made by Sachs in 1882. He noted that the growth of new shoots from excised Begonia leaves required 6 months in leaves coming from vegetative plants but only 2 months in leaves from plants that had been induced to flower.

Respiration was the first major metabolic function of the

plant to receive systematic study in relation to flowering. Before much interest was taken in photoperiodism Kidd et al. (1921) had already shown that the respiration of *Helianthus annuus* followed a downward track in its activity in the course of the life cycle of the plant, i.e. from germination to flowering. These authors correlated this effect with the similar falling off in the activity of the apical meristem. Bouillenne et al. (1930, 1931, 1935) studied the relative rates of respiration in the male and female plants of *Mecurialis annua* and *M. perennis* during their life cycle in 1935 and concluded that the different flowering habits of the two sexes caused the differences in the respiration rates observed.

Roberts et al. (1937) in investigations dealing more specifically with the differences in respiration between plants that had been photoperiodically induced and plants that had not been induced found that with plants that had been made to flower that there was an increase in the respiration rate. Changes in carbon dioxide exchange were also related to the induction of flowering. Bode (1942) found with Kalanchoe that both respiration and photosynthesis were stimulated by the photoperiodic stimulus. Harder and Bode (1943) found further that the succulence of the leaves, their respiration and photosynthesis activities reacted to the light break, which prevented flowering, in the same way as they would react to long days where also they would produce no flowers.

The discovery that a short light break, Hamner and Bonner (1938), incapable of adding anything to the photosynthetic requirements of the plant opened up many experimental possibilities such as those described above of Harder and Bode, which have helped greatly in the simplification of experiments into the physiology of photoperiodism.

More recently Elliot and Leopold (1952) found that with leaf discs from long day plants the oxygen absorbed per unit dry weight decreased on flower induction. With a similar trial on day neutral plants the oxygen absorbed in respiration was directly proportional to the light that the plants had received during growth. They also found a correlation between the respiration activity and the degree of flowering in response to the first days of photoperiodic induction.

Interest switched to the fixation of carbon dioxide rather than

to its evolution with the discovery in 1940 of Parker and Borthwick with Biloxi soya bean, a short day plant, that if no carbon dioxide was present in the atmosphere around the plant during the induction period then no flower induction took place. These authors were also able to establish a direct quantitative relationship between the amount of flowering and day length and between flowering and the carbon dioxide concentration in the atmosphere. A minimum of two hours light was necessary, eight hours being the maximum. The fixation of carbon dioxide has been studied subsequently with relation to photoperiodism both in light (photosynthesis) and in the dark.

With the discovery that it was the length of the dark period that controlled the response of the plant to day length, more attention was turned to studies on gas exchange from the leaf during darkness. In investigating the role of carbon dioxide in the night atmosphere, Harder et al. (1944) found with Kalanchoe that the presence of carbon dioxide in the night atmosphere was necessary for flower induction to be successful.

Kalanchœ being one of the Crassulacae is able to fix carbon dioxide during the night into the organic acids, (see Thomas 1049, Bennet-Clark 1933). Spear and Thiman (1954) investigated the course of carbon dioxide fixation in Kalanchoe during the night with and without the treatment of the light break. Raising the temperature or exposure to light during the night resulted in carbon dioxide evolution. Gregory et al. (1954) also showed that after the treatment with the light break that there was no further fixation of carbon dioxide during the remainder of the night. These authors also showed that there was an evolutionary burst of carbon dioxide given off from the leaves immediately the light break was given. Similar results were found by Schmitz (1951) using nights of abnormal length and also by Becker (1953).

Kunitake et al. (1957) examined the fate of carbon dioxide containing carbon 14 in the dark with long and short day treated Kalanchoe plants. Detached leaves were given exposures of 10 to 30 minutes to the isotope marked carbon dioxide. The results showed only quantitative effects in the total amounts of carbon dioxide fixed in long and short day treated leaves. Neither the pattern of fixation nor the percentage labelling of the different products changed with the day length treatments. Malic, citric

and aspartic acids were found to be the compounds most actively labelled irrespective of whether the plants had received a flower inducing stimulus or not.

Langston and Leopold (1954[a]) investigated the dark fixation of carbon dioxide in plants not of the Crassulacae and consequently not having their abnormal powers for the dark fixation of carbon dioxide. With the short day plants, Biloxi soya bean and *Xanthium commune* photoinduction was inhibited when no carbon dioxide was present in the night atmosphere for fixation. With the long day plant *Hordeum vulgare*, the absence of carbon dioxide during the night caused only a 15 % inhibition of flowering. However, photoinduction promoted the dark fixation of carbon dioxide in all three species. Night interruption by a light break stabilized the fixed carbon dioxide in barley but had the opposite effect in the short day species. Thus they concluded that the dark fixation of carbon dioxide in the short day species of Xanthium and Soya was important in the induction of flowering. Sen and Leopold (1956) exposed the short day plants Biloxi soya bean and Xanthium and the long day plant Hordeum to carbon dioxide containing C. 14, as did Kunitake et al. for Kalanchoe. After killing the leaves in alcohol they investigated the fate of the C. 14 atoms. They found that the length of the dark period could influence the subsequent photosynthetic fixation of carbon dioxide. The longer the dark period that the plants had, the greater was the subsequent photosynthesis, irrespective of whether the plants had been treated with long or short days. They also found that the light fixation products rapidly change in the dark. In particular there was a depletion in sugars and a rise in the organic and amino acids. These authors concluded that it was the interaction of the periods of night and day that caused the alternation in the carbon dioxide fixation pattern.

The photosynthetic fixation of carbon dioxide has been investigated with relation to short and long day treatments of plants by Norris and Calvin (1954, 1955) and by Sen and Leopold (1956). Norris and Calvin examined the early products of photosynthesis from 5 minute exposures to carbon dioxide 14 containing carbon in an attempt to see if the path of carbon in photosynthesis (see Bassham and Calvin 1957) changed with the response of the plants to flower induction. These authors

used short and long day treated Kalanchoe plants at the onset of flowering and compared the results obtained with these plants with data from plants which had reached the stage of fruit development. They found that the total activity of their extracts was greater with short than with long day treated plants. This agrees with the manometric data of Bode (1942). In the short day treatment there was much less fixation at the fruiting stage than at the onset of flowering. However the light intensities used in the photosynthesis expriments varied between the first experiments at the onset of flowering and the later ones at fruiting so the comparisons are of doubtful value. With the plants used at the onset of flowering less C. 14 is incorporated into glycine than in the corresponding treatment with long day plants. It is not certain however if this was due to a greater synthesis or a greater use of glycine. Similar differences were also found for serine and alanine. Phospho-glyceric acid was also more actively marked in the short day plants than in the long day ones when the plants were taken at the onset of flowering. This position was reversed later at the time of fruiting.

Sen and Leopold (1956) when investigating the fate of carbon 14 in photosynthesis in a variety of plants grown in both inductive and non-inductive day lengths found little or no labelling in the sugar phosphates. Nevertheless, Leopold stated that photosynthesis took place in both cases. How sucrose could be synthesised without the labelling of the sugar phosphates is something quite new to the general schemes that are generally accepted for the path of carbon dioxide fixation in light ? (Bassham and Calvin, 1957).

Mechanism of reception of the light stimulus.

As the length of the dark period which controls flowering can modified either by a flash of light or a continued light treatment of very low intensity, it was natural that many workers should make use of these findings in order to separate the effect of light upon the plant purely for photosynthetic purposes and the effect of light in the stimulation of the plant to flowering. The promotion or prevention of flowering can thus be brought about by a quantity of light that is far too small to have any appreciable effect on the total photosynthesis of the plant. The treatment however is also due to light and therefore like photosyn-

thesis it must act through changes caused in the state of a pigment. The first step in such investigations to find out what such a pigment could be was carried out by Withrow and Benedict (1936). These authors extended the day length given to plants by using supplementary light of different intensities and wavelengths. These experiments like many others gave only general indications and failed to identify any pigment as the light given in the supplementary periods was not monochromatic (see also Flint 1934, Funke 1948). Katunsky (1937) showed that the action spectrum for flowering and the absorption spectrm of chlorophyll were similar. Harder et al. (1946) found that the action spectra for photosynthesis and for flowering as controlled by photoperiodism were similar.

It was not until the team of Borthwick, Hendricks and Parker started precise biophysical researches using monochromatic light that this problem of the receptor pigment for the control of flowering by day length began to be clarified. These authors were able to simplify their researches by making use of their first observations (1948) that the action spectra for the photoperiodic control of flowering was the same as that which caused the elongation of barley shoots and the germination of lettuce seeds. Many other test materials were soon found, including the elongation of leaf hairs, the germination of ferm spores and the elongation of hypocotyls.

The discovery that was responsible for this unification of research was that of the reversibility of the red light induction in infra-red. In every case it was found that the promotion of flowering, seed germination or whatever growth process that was being studied was brought about by the same wave-length of red light and that in every case this could be reversed by the same infra-red treatment, (Borthwick et al. 1952, 1954. Hendricks et al. 1956 and Mohr 1957). The red-infra-red treatment could be repeated several times and the resulting response depended only on the nature of the final radiation, the result being positive in the case of red and negative in the case of infra-red.

In all these experiments on the activation of some morphogenic process by light the most effective regions of the spectrum were found to lie between 6,000 and 6,600 Å and 5,000 and 5,600 Å. The far red effect which can reverse the effect of the light break was active beyond 7,200 Å. These authors (Borthwick et al.) drew

particular attention to the fact that the maximum effect was obtained at 6,500 Å whereas the maximuma absorption of chlorophyll occurs at 6,800 Å.

The action of light on the metabolism of chlorophyll attracted considerable interest after the above researches had shown that there was some possibility of a connection of this with the control of flowering by day length. Bonnier in 1895 had already described an increase in chlorophyll content on transplanting plants to higher altitudes on a mountain. He attributed the increase in pigment content of the leaves to the greater intensity of the light on the higher parts of the mountain. The works of Willstätter and Stoll (1918) which for a long time were considered the standard reference for information on chlorophyll content in leaves, state that for whatever species or variety that may be examined there is a remarkable constancy in the amount of chlorophyll that will be found in the leaves. These results were accepted for some time by other authors (see Zeller 1935).

Schertz (1929) was the first to publish data which showed that the chlorophyll content of the leaves varied to any extent. Working with *Buxus sempervirens* he showed that the chlorophyll content of the leaves varied throughout the season.

Some of the earliest researches on the synthesis of chlorophyll were published by Lubimenko and Hubbenet (1932). They found that if etiolated leaves were placed in light for short periods then all the protochlorophyll passes to chlorophyll. Hubbenet also showed (1938) that alternating periods of light and dark accelerated the dark process involved in the synthesis of chlorophyll. At this time Murneek (1937) found that the amounts of carotene and xanthophyll in the leaves of Soya changed on flowering. The rapidity of the changes in chlorophyll content was demonstrated by Strott (1938) who found that on transferring leaves from the light to shade that the chlorophyll content varied in three to eight days. That this lability of pigment content could be seen much more rapidly was shown by Sironval (1953). After these publications, including others by Bukatsch (1940) and Wendel (1940) on the hourly variation in chlorophyll content throughout the day it is strange to read that Seybold in 1941 contradicts these papers on the variability of the chlorophyll content of leaves, and reaffirms the work of Willstätter and Stoll on the constancy of chlorophyll content from species to species and from one variety to another.

The first figures on the chlorophyll content of leaves with regard to the control of flowering by day length were published by Bode (1942). This author found that on transferring plants from long days to short where they flowered, the material being Kalanchoe, that there was an increase in the amount of chlorophyll in the leaves. These results were confirmed by Taranez (1950) who worked also with Kalanchoe but also added Perilla and Spinacia to the list.

Sironval (1953) deals with the parallelisms between the chlorophyll content of the leaves with regard to day length in much greater detail. This author working with strawberry is careful to describe the course of chlorophyll content of the leaves throughout the life of the plant and with regard to the development of the leaves. The same author in 1957 shows that at the moment of flowering there is a reduction in the amount of chlorophyll in the leaves irrespective of whether the plants flower rapidly in a suitable photoperiod or more slowly in a less favourable photoperiod. In either case the chlorophyll content of the leaves and in particular the youngest leaves falls at the moment of the onset of flowering. Chlorophyll accumulation in the leaves during the growth of the plant is always greatest in plants that are exposed to a suitable photoperiod for flowering irrespective if it were long or short days. Similar results are published for *Cannabis sativa* by Cheuvart (1954). Sironval (1957) refers to Schöpfer (1949) in the suggestion of a possible explanation of the change in chlorophyll content of the leaves at flowering. Schöpfer describes the path of the phytol chain of the chlorophyll molecule which on hydrolysis from the parent chlorophyll molecule can be used in the synthese of vitamins E and K. The use of these vitamins is thought to be in connection with electron transfer in respiration. Thus it is possible that the diminution in chlorophyll content may give rise to additional amounts of these vitamins which could be required by the plant at a time of active growth such as the onset of flowering.

Sironval was able to make an extract of vitamin E from the leaves of induced strawberry plants which hastened the flowering of plants on the threshold of flower production.

A separate approach to the possible role of chlorophyll in the control of flowering by day length has been made by Virgin. In 1955 this author confirmed the results of Lubimenko and Hubbe-

net on the transformation of protochlorophyll to chlorophyll « a » when etiolated leaves are given short periods of illumination. Virgin (1958) found further that pretreatment with red light resulted in the disappearance of the lag phase in the formation of chlorophyll. It was then shown that it was the synthesis of protochlorophyll that was affected by this treatment. Equal accelerations in the formation of chlorophyll « a » were found after irradiation with red or blue light, this was also shown to be due in both cases to an increase in the amount of protochlorophyll formed. The effect of pre-irradiation with blue and red light showed a sensitivity that was 22 times greater for red than for blue. This meant that the sensitivity in respect to the lag phase could never manifest itself in continuous light. Such an effect would only show itself when short light impulses are followed by a period of darkness before a period of continuous irradiation. Such phenomena could have a very important bearing in the reception by the plant of the effect of the light break which is so often used in experiments on photoperiodism.

This mechanism explaining the activation of the synthesis of protochlorophyll and the subsequent effect on the content of chlorophyll « a » could well explain the results of Sironval (1957) which draw a parallel between the metabolism of chlorophyll and the flower induction of the plant, using the classical light break methods.

Working with an extended day and night cycle of 72 hours, Clauss et al. (1959) showed that chlorophyll content, dry weight and nitrogen content followed the same curves in relation to the timing of the light break throughout the 72 hours cycle with both long day and short day plants. In each case the maxima were 24 hours apart. It is therefore also possible that chlorophyll content and its change on the leaf throughout the periods of light and darkness could play a role in the reception of the flowering stimulus as predicted by the therory of Bünning (see page 36).

The latest work on the precise nature of the pigment that is activated by the light break treatment confirms the earlier experiments of Borthwick et al. (1945) where they showed that the pigment must belong to the tetrapyrole class. It is now considered that the pigment is not chlorophyll (Mohr — personal

communication) or indeed a ring compound but a straight chain tetrapyrolic substance.

Other metabolic changes produced by photoinduction.

Other aspects of the plant metabolism that have been noted to change with the onset of flowering include the sugar content of the sap and the activity of certain enzymes connected with respiration.

Bouillenne et al. (1940) describe the change in sugar content of sugar beet plant during its life cycle and at the moment of flowering. The same study was also carried out by Bouillenne et al. (1935) on *Mercurialis* (two speciès) with regard to the different flowering habits of the male and female plants. Hibberd (1937) finds that the fermentative powers of Soya sap vary with the photoperiodic treatment. With *Sacharrum officinarum* Roubini (1941) found that the invertase activity changed with the photoperiod. The hydrolytic activity remained constant in both short and long days but varied throughout the course of the day. Other enzymes that altered their activity with the course of the day but which were not affected by day length were phosphatase and amylase (Ehrenberg, 1950).

The B vitamins were investigated with regard to photoperiodism by Langston and Leopold (1954[b]). Working with winter barley (*Hordeum vulgare*) they found that after 0 to 7 photo-inducing cycles that there was an increase in the amout of biotin, niacin and panthothenic acid, whereas the riboflavin content remained constant. They suggested that these substances could have a possible relation to the fixation of carbon dioxide as they are thought to act as co-factors in the enzymatic changes in the Krebs cycle.

Madan and Chang (1956) found that the amino acids increased in the stem apices of induced buds from the first induction day. In particular aspartic acid showed a clear augmentation.

The effect on flowering of substances applied to the plant.

Of all the substances that have been studied with regard to their effect on flowering the auxins and related compounds have received the greatest amount of attention. Dostal and Hosek (1936) were the first to show that flowering could be inhi-

bited in day neutral plants by the application of auxin. Apart from these early works, little was published until after the end of the second World War. Bonner and Thurlow (1949) found with Xanthium that if indole acetic acid (IAA) or naphtalene acetic acid (NAA) were applied to the leaves during the induction period then the initiation of flower primordia was suppressed. When such treated leaves were afterwards grafted to other plants no flowers were produced. These authors also found that application to the leaves in a similar manner of the anti-auxin *dichloranisole*, hastened the development of the flowers. In further experiments on Xanthium (1949), Bonner found that the anti-auxins 2,4 dichloranisole, triiodobenzoic acid would initiate flowers in Xanthium plants growing in long days where they normally would remain vegetative. Similar results were obtained by Harder and van Senden using the short day plant Kalanchoe (1949). They found that increasing concentrations of growth substances would inhibit flowering without damaging the vegetative growth of the plant. On the contrary the treatment promoted the growth of more leaves and a longer stem. Laibach and Kribben (1950) working with Cucurbita (Gurke) found that treatment with NAA caused the axillary shoots that would have normally remained male to become female or vegetative.

Galston in his work on IAA oxidase (1954) claims that this enzyme is of principal importance in controlling the amount of IAA that is in the tissue in an active form. He considers it is the change in the activity of this enzyme in long and short day treated plants that controls the content of IAA in the plant and that the differences in the IAA concentration then influence the flowering of the plant, (see Hillman and Galston, 1957).

Salisbury and Bonner (1956) investigated the effect of auxin applied at different moments of the 24 hour cycle during the induction period. They found that the most effective time was two to three hours after the beginning of the dark period. When applied at other moments of the diurnal cycle, it was shown that the auxin applied had little effect on the length of night period required to induce flowering. This experiment was on short day plants. On long day plants, Liverman and Lang (1956-1957) working with *Hyoscyamus niger* and *Silene armeria*, found that the application of auxin to the leaves could induce flowering with plants grown under threshold conditions.

Salisbury (1957) surveyed the effect of various growth regulators on flowering. He found the malic hydrazide, 2,2 dichloropropionic dinitrophenol, appeared to inhibit the flowering of Xanthium through blocking flower induction and bud development. The cobaltous ion appeared to interfere with the mechanism that controlled the critical length of the night, as in contrast to the other substances tested it had to be applied during the dark period in order to be effective.

Brian (1958) has investigated the effect of gibberellic acid on the flowering of the plant with particular regard to photoinduction. This substance can be classed with the auxins in its action which inhibits the flowering of short day plants. However, it seems to be more effective than the auxins in its effect on long day plants where the plants do not have to be on the threshold of flowering for a positive result of promotion of flowering to be obtained.

Many experiments have been carried out on the effect of feeding the plants with sugar and the consequences of this on flowering. Melchers and Lang (1942) found that the infiltration of sugar into the leaves of short and long day plants altered the response of the plants to photoinduction. Many authors (see Lang 1952) have found that part of the high light intensity process which is a necessary pretreatment of the plant in order to bring them to a condition where they can be used in experiments with critical night lengths for photoinduction, can be replaced by feeding the leaves with sugar. The conclusion is that this feeding is only a partial replacement of the photosynthetic requirements of the plant.

Bonner J. and Bonner D. (1948) found that the extract of the vegetative point of a particular adult individual of the palm tree *Washingtonia robusta* induced flowering in *Xanthium canadense*. As they were unable to repeat this experiment with other palms of the same species, the results have but limited interest. Loehwing mentions the results from a similar experiment (1948). The effect of extracts on flowering in general is reviewed by Roberts (1951). The effect of vitamin E synthetically prepared or extracted from induced plant of strawberry on the promotion of flowering in strawberry under precise conditions has been described by Sironval (1957).

Theories of flower induction.

Klebs (1918) was one of the first authors to publish a general theory on the flowering of plants. He considered that is was the ratio between carbon and nitrogen that determined the nature of the plant's metabolism and whether flowering would take place or not. By carbon he meant the photosynthetic products of the plant in particular the soluble sugars, and it was the balance of this fraction against the nitrogen absorbed by the roots as nitrate or ammonium that caused the plant either to grow in a luxurious manner with the production of many leaves and with little or no flowers, or whether vegetative growth would be restricted and the plant could start to produce flowers. The discovery of the control of flowering by day length where flower induction took place without any change the carbon nitrogen ration of Klebs caused this theory to be put aside. Grainger (1941) did however revive it in a review on the metabolism of flowering. Although the scientific value of the theory is probably very small as in general all that is affected by the carbon /nitrogen ratio is the quantity of flowers produced by the plant in proportion to the amount of leaves, this rate is of great commercial importance and much attention is still paid to the carbon /nitrogen ratio by horticulturists.

It had been generally accepted since the days of Sachs that at flowering a stimulus passed from the leaves to the meristem, and without this stimulus the meristem was incapable of producing flowers. The grafting experiments earlier described (see p. 12) were able to prove the truth of this hypothesis. That a stimulus should be produced in an organ by a substance that migrates from its site of production somewhere else is the definition that is usually accepted for a hormone in animals. Knott (1934) and Cajlachan adapted this idea to the control of flowering by the leaves and produced separately what is now known as the florigen theory. The hormone is supposed to move in the mass flow of photosynthetic material out of the leaves during the period of obscurity (Carr, 1957). The effect of light intensity on the leaves and on the apical bud as well as the effect of supplying sucrose to the leaves is also discussed by Carr. He finds that the effect of auxins also agrees with the theory that the flower pro-

moting substance moves passively with the photosynthetic stream.

In spite of this evidence and the very clear demonstrations from the grafting experiments, no isolation has yet been made of a substances that will induce flowering in vegetative plants. All that can be done is to hasten flowering in plants that are on the verge of flowering or prevent flowering in plants that should normally flower.

The clearer cases of the addition of substances that cause the inhibition of flowering has parhaps been the cause of the formulation of the anti-florigen theory of Lona (1948). This author working with *Chenopodium amaranticolor* in long days where flowering is normally not seen, found that if the leaves were removed from the plants as they appeared and the plants were supplied with a nutritive sucrose solution, then flowering would take place. No flowering took place in feeding the plants with sucrose and leaving the leaves on the plant. He therefore concluded that the flowering of the plants was inhibited in long days by the presence of the leaves.

The inhibitory effect of leaves was already well known long before the esperiments of Lona. Loehwing (1938) and Hamner and Bonner (1938) had already shown that if only one part of a plant had received the flower inducing stimulus, flowering would only be successfully achieved if the leaves from the non-induced portions of the plants were removed. These non-induced vegetative leaves inhibited the flowering of the plant. The same results with experiments using grafted leaves were found by De Zeeuw (1954). A possible explanation is presented by Lang (1952) in that the non-induced leaves may prevent the transport of florigen.

In 1948 Harder produced his metaplasm theory which in principal differs but little from the theory of Lona. Harder calls the metaplasm that part of the plant tissue that produces a substance antagonistic to the flowring of the plant when kept in day lengths that do not permit of the development of flowers. The hormone theories are reviewed in general as regards the problem of a flowering or anti-flowering hormone theory by Denffer (1950). Here he considers an idea of Gregory which stresses the unspecific nature of flower induction and sees no reason why flower induction could not be caused by lack of

nitrogen or some other relatively simple metabolic need, the absence or presence of which could inhibit flowering. In his general outlook, Denffer is inclined to favour the anti-florigen theory.

An entirely original theory was first put forward to explain, the photoperiodic reactions of plants by Bünning (1936). Bünning after observing the movements of leaves throughout the 24 hour cycle of day and night, noticed that the movements of the petioles and leaf blades followed periodic patterns in relation to the passing of day and night. It was also seen that the movements of all plants were not the same type as regards the timing of their responses to the day and night cycle. Bünning further noticed that the flowering of plants in long or short days could be correlated with the type of movement pattern that their leaves showed. These observations caused Bünning (1950) to produce his photophile and skotophile theory on the endogeneous rythms in plants. In this theory he supposes that the plants have a period when they react favourably to light and a period when the preference of the plants is for a period of darkness. The moment of onset of these different preferences varies with the species and variety of plant. Bünning suggests that it is just this difference that accounts for the different photoperiodic reactions of plants.

Bünning and his co-workers have carried out considerable researches into the various aspects of the plant 's metabolism that could underly the possible explanations of these periodicities. Rau (1954) has investigated the total synthetic abilities of the plant and the content of the leaves in nitrogen using nights of abnormal length. In these experiments additional light was given at different moments in order to supplement the light given as a short day at the beginning of each cycle. The results showed maximal synthetic activities when the additional light was given at that moment of the night which was most favourable to the flowering of the plant. However, it was found impossible to distinguish the reaction of short day plants from that of long day plants and this caused Bünning to abandon part of his theory on the possible preference of certain hydrolytic versus synthetic processes on the timing of the endogeneous rhythms.

Bünning's theory although disregarded by many, as there seems at the moment to be no logical explanation of a mechanism

in the plant which would react in accordance with the theory, has nevertheless its values. These are pointed out by Liverman (1955) where he shows that this theory can predict with great accuracy the moments at which such treatments as the interruption of the night by a flasch of light will be most effective.

Liverman (1955), considering all the facts of flowering, unites them into a theory proposing a certain chain of events leading to the induction of flowering. He considers 5 separate reactions (taking place in one photoinductive cycle) : —

a) The high light intensity process — photosynthesis.
b) A dark process.
c) Second high light intensity process.
d) Hormone translocation.
e) Bud differentiation.

That the first process could be replaced by sugars was shown by Melchers and Lang (1942). Liverman and Bonner (1953) also found similar results and concluded that there is no reason to considerer the first reaction as anything other than a photosynthetic requirement.

The dark process remains more of a mystery. It requires the presence of carbon dioxide and can be inhibited at low temperatures. It is regarded by some as necessary for the stabilisation of some pigment (Liverman 1955) or for the translocation of some other metabolites out of the leaf.

The second high light intensity process also appears to be photosynthetic as it requires the presence of carbon dioxide around the illuminated leaf. (Synder 1940).

The necessity of the translocaion of some hormone like substance before bud differentiation can begin has also been discussed (see page 13).

A possible theory of how the pigment change that is induced by the treatment of the leaf by a flash during the night might lead to the production of a hormone has been proposed by Borthwick (1952). He supposes that the pigment (P) reacts with some reactant (RA)

$$P + RA = PR + A$$

Then some other molecule (M) reacts with the product of the previous reaction.

$$PR + M = PRM$$

This last complex would then be the flower inducing substance.

Another interpretation essentially the same principale has been suggested by Sironval (1957). In the change in the state of one pigment as proposed by Borthwick, Sironval points out how this could also influence the amount of other substances requiring the same molecule for their synthesis. The receptive pigment is considered to be a tetra-pyrolic compound and any change in the steady state of this nucleus could influence also the steady state of chlorophyll and terminal oxidases as well as the vitamines E and K. All this could have a very profound effect on the metabolism of the plant even although the pathway of the reaction is more devious than others that are usually considered.

In short, the theories of flowering can be classed as either hormone theories or theories based on the change of the pattern of the plant's metabolism due to different day lengths. The hormone theories whether florigen or antiflorigen are essentially the same, the one just being the other with a negative sign placed in front. In neither case has the essential proof of the isolation of the hormone been made (R. Bouillenne, 1961).

With the more complex metabolic theories based in general on the reception of the stimulus by a pigment with subsequent changes in the biochemical processes of the plant's metabolism which in turn have their effect on growth and flowering, it is only the nature of the receptive pigment that is known with anything like certainty. How the light stimulus brings about the changes observed in the meristem is only a matter of conjecture.

THE PLANT MATERIAL AND ITS CULTIVATION IN THE PHYTOTRON OF LIEGE

The research began by searching for a plant that would be suitable for the work envisaged. The properties looked for included healthy growth in the constant temperature conditions of the Phytotron, quick flowering, a distinct photoperiodic effect and an easily excisable stem apex. A plant of small size would also be an additional advantage in order that large numbers of the plants could be cultivated. Uniformity of the material would be essential in order that the contemplated biochemical studies could be repeated at different times.

The following plants were tried, *Zinnia elegans*, Jacq., var. double demi-nain, and also var. double cupidon, *Amaranthus tricolor* L., *Soja capitol* (Glycine max. Merr.) and *Salvia splendens*, Sello, var. Feu de la Saint Jean, at the suggestion of Prof. R. Bouillenne. Of these plants Amaranthus was rejected due to the variability of the anthocyanin content of the leaves. The soya beans were rejected due to the extremely hairy and glandular nature of the young leaves which made the excision of the apical bud difficult. Both the Zinnia varieties were discarded as no distinct photoperiodic effect could be found between the flowering response to 8 and 16 hour days.

Thus, of the plants tried *Salvia splendens* was the only one found to meet the requirements of the proposed research.

The variety Feu de la Saint Jean has long been in extensive horticultural use in Belgium and thus a plentiful supply of seed of a well selected stock was available. The plants are very uniform in growth rate, habit, leaf form and flower colour.

Salvia splendens, Sello (S. colorans, Hort.) scarlet sage, sauge écarlate, is in nature a shrub growing to a height of three feet. In cultivation in northern Europe, it blooms in late summer (June to October). The species is a native of Brazil (for description see Bailey 1949). Seeds were obtained from Belot-Etienne et Cie, S. A., Liège.

Cultivation.

Before use the seeds were always kept stored in a desiccator at 5° C. Without any further pretreatment they were sown in the following sterilized soil mixture :

oak leaf mould	2 parts by volume
grey loam	1 part by volume

The source of both the above ingredients was always the same, thus approximately the same soil mixture has been in use throughout all the experiments.

The seeds were sown with only a very light covering of soil, in 7 cm deep composition (eternite) boxes. Germination took 8 days at about 20° C. During germination the seed boxes were kept in a greenhouse (heated in winter to 20° C.) until the 7th day when they were placed in the Phytotron. The Phytotron of the University of Liège is conditioned by a rapid air circulation admitted through the floor of the growth chambers. For a full description see Bouillenne and Bouillenne-Walrand (1951) and for a comparison of this type of Phytotron with others in use see Went (1957). A description of the uses of the phytotron is also given by Boullenne (1958). Illumination was by means of « Phytor » fluorescent light tubes giving an intensity of 4,500 lux at a distance of 30 cm measured under the centre tube of a battery of 4 tubes. The spectral composition of the light of these tubes is described by Bouillenne and Fouarge (1953). In order to avoid the effects of uneven lighting on the plants, the tables on which they were placed were turned daily on their wheels.

For the experiments using pots, the plants were singled out into 6 cm pots when they had attained an age of 16 to 17 days. These pot experiments were the only occasions when the plants were transplanted. For the respiration experiments and for the growth of plants for the making of microscopical preparations the plants were kept in the boxes in which they were sown. In these cases of non-transplanting, the plants were thinned out at regular intervals, beginning at the 10th day. This thinning out had to be rigorously applied otherwise seed germinating after the 8th day would not have received the same number of light days as the earlier germinating plants. In the collection of plants for the microscope preparations and the respiration ex-

Photo : R. Sauveur.

Fig. 1. — *Salvia splendens* Sello, var. feu de la Saint-Jean, a long day plant at 65 days : on left, grown in 16 hour days. On right, grown in 8 hour days, in the Phytotron, with fertiliser and artificial light given by Phytor tubes. Height in cm, 24.

periments, the possible source of error is not serious as the plants are selected not only for uniformity of age, but also for uniformity of growth.

In a preliminary growing experiment, considerable chlorosis of the lower leaves was noticed, which led in extreme cases to the premature shedding of these leaves when the plants were kept until they were in full bloom (65 days). Watering once a week with the following fertilizer solution removed this trouble without making any difference to the growth rate of the plant or the time of flowering. (See table I, page 43 and fig. 1).

Fertilizer solution :

Nitrogen as nitrate	7.5 %
Nitrogen as ammonia	7.5 %
Potassium hydroxide	26.0 %
Phosphoric acid soluble in ammonium phosphate	20 %

The mixture is sold as « Rose Engrais » by the Société Belge de l'Azote.

This nutritive watering was carried out without exception in all the experiments that were carried out at Liège.

A distance of 30 cm from the lamps to the soil was kept throughout all the experiments on respiration rates and in all other experiments dealing with young plants. On extended growth experiments on flowering in which the plants gained considerably in height, the lights were kept as near as possible to a distance of 30 cm from the stem apex to the lamps. In this way the young leaves of all the plants were exposed to approximately the same light intensity.

In all the experiments the relative humidity was kept at 80 %.

PART I.

The development and autoecology of Salvia splendens. (Sello). Var. Feu de la Saint Jean in the constant conditions of the Phytotron.

The effect of day length on growth and flowering.

Before any beginning could be made on the study of the biochemical changes accompanying flowering, it was necessary to determine exactly the conditions, day length, age of plant, and temperature, that regulate the flowering of the plant. Little is known of the day length responses of this variety of *Salvia splendens* when grown under precise experimental conditions, therefore the first step consisted in determining the photo periodicity of the plant, whether or not flowering required a particular length of day, and if so, was this requirement modified in any way by other factors mentioned above, age and temperature ?

Experiment to determine the flowering of Salvia in 8 *and* 16 *hour days at* 20° *C.*

Method.

Salvias were grown as described in the section on cultivation. The seed boxes the day before the plants were expected to germinate were placed in the Phytotron in 8 and 16 hour days. Picking out into 6 cm pots took place at the 17th day when the plants had attained their first pair of true leaves. Fifteen plants were kept in both the long and short days.

The plants were examined biometrically at weekly intervals. Of the fifteen plants in each treatment, one was selected at every

examination that represented the mean of the population. The height is measured as the distance from the soil to the topmost visible node, i.e. immediately below the terminal bud. These results, along with the moment of apparition of the flowers are recorded in table I and fig. 2.

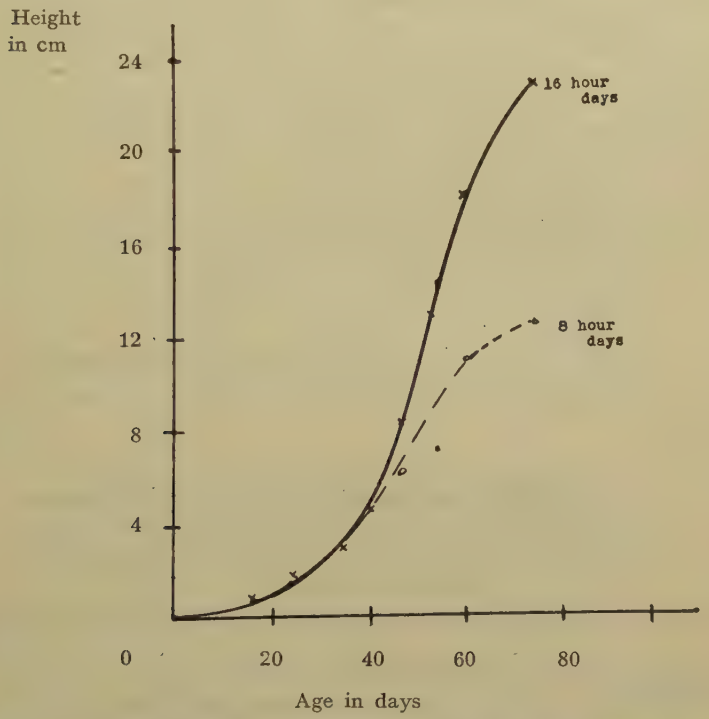


Fig. 2. — Growth in height of Salvia when cultivated in 16 and 8 hour days with fertilizer.

Results.

When the plants were grown in long days the flowering bud is discernible with the naked eye after 40 days. In this expement all the plants were in flower by the 40th day. This change from leaf to flower production took place at the 6th node. When the plants were kept in short days, no flowers were produced even on keeping the plants up to the 76th day after sowing, by which time they had attained their 11th node. The experiment was discontinued here as the 8 hour day plants showed no sign

of flowering and had had twice as long a time as the long day plants needed for 100 % flower production. (fig. 3).

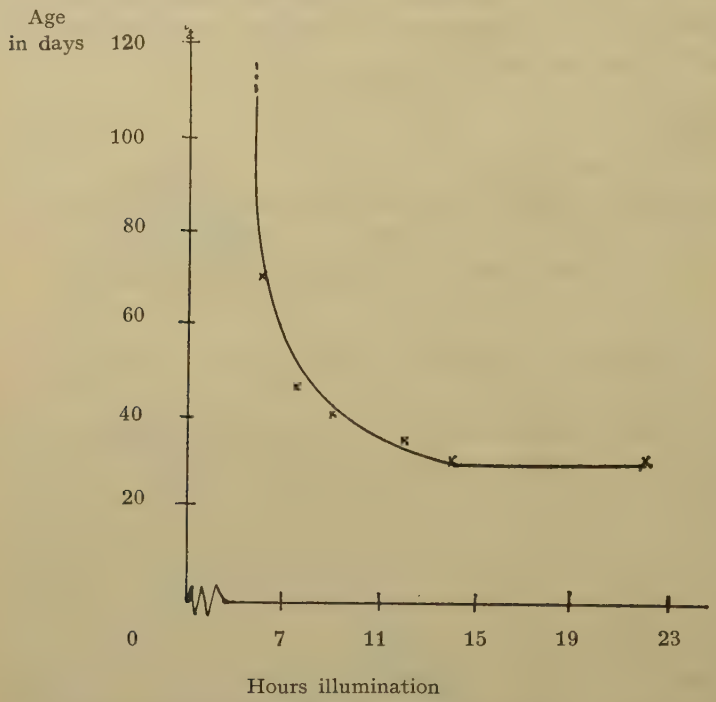


FIG. 3. — Age of plants on flowering when grown in days of varying length.

Conclusion.

Salvia splendens at 20° C. and in the conditions of growth provided by the Phytotron behaves as a plant that will flower normally in long days. The short day plants were shown to have maintained their vegetative state well after the long day plants were in flower.

However, in view of the opinions of modern authors on photoperiodism that the majority of plants have no absolute preference for long or short days but merely react more favourably to one than the other, it was necessary to carry out a similar experiment but using a greater number of plants and prolonging the observations on the short day plants.

TABLE I

COMPARISON OF THE GROWTH AND FLOWERING OF SALVIA, WITH AND WITHOUT THE ADDITION OF FERTILIZER SOLUTION (MEAN OF 15 PLANTS).

Age in Days	Without fertilizer				Age in Days	With fertilizer.			
	16 hour days		8 hour days			16 hour days		8 hour days	
	cms. height	No. of Nodes	cms. height	No. of nodes		cms. height	No. of Nodes	cms. height	No. of Nodes
18	–	–	–	2	18	0.6	2	0.7	2
24	1.7	2	1.2	2	24	1.6	3	1.3	2
34	2.5	4	2.5	3	33	2.8	5	2.4	4
41	4.2	6	3.1	5	40	4.4	6 (F)	4.3	5
48	4.8	6 (F)	3.5	6	47	8.2	6 (F)	5.0	6
55	7.0	6 (F)	5.9	7	54	12.8	6 (F)	7.0	7
62	–	6 (F)	6.1	7	61	17.2	6 (F)	11.3	8
69	18.0	6 (F)	7.8	10	76	23.0	6 (F)	12.5	11

(F) = Plant now in flower, only vegetative nodes preceeding flowering are recorded.

Experiment using large numbers of plants to observe the growth and flowering of Salvia splendens kept for three months in 8 and 16 hour days.

Method.

In order to have sufficient numbers of plants, the experiment was carried out growing the plants in boxes 30 × 30 × 6 cms. The plants were kept in the boxes in which they were sown as described in the section on cultivation. Thinning took place at the 11-12th day and again the 20th day leaving, after the two thinnings, approximately 30 plants per box.

Two boxes were kept in long days and two in short. The growth and flowering are recorded in table II. The percentage figures represent the percentage of the plants having flowering buds that could be discerned with the naked eye. By calculation 50 % of the plants were in flower at the 36th day.

Results.

Although the growth figures differ from those with the previous experiment where the plants were grown in pots, (see

TABLE II

GROWTH AND FLOWERING OF SALVIA WHEN CULTIVATED IN BOXES.

Age in Days	16 hour days		8 hour days	
	cms. height	Percentage of Plants in Flower	cms. height	Percentage of Plants in Flower
19	1.4	0	1.3	0
26	3.4	0	2.6	0
35	6.2	23	3.7	0
40	8.7	65	5.3	0
46	11.0	100	8.0	0
54	15.4	–	12.6	0
62	19.0	–	14.0	0
90	–	–	20.0	2.5

By calculation, 50 % of 16 hour day plants in flower at 36th day.

TABLE III

AVERAGE AGES OF PLANTS GROWN IN BOXES IN 8 AND 16 HOUR DAYS ON ATTAINING THEIR 1ST, 3RD AND 5TH VEGETATIVE NODES.

	Node			
Day length	1st	3rd	5th	
8 hours	15,5	29,7	47,7	age in days
16 hours	14,4	24,7	43,2	

table III), there seems to be no appreciable difference when grown in boxes of the flowering response of the plants. The greater elongation of the stems would be due to the greater compaction of the plants in the latter experiments. 50 % of the population was in flower at the 36th day and 80 % at the 40th day, whereas in the previous experiment with the 15 plants in pots all were in flower at the 40th day. Using the greater number of plants some variation could be detected in the number of nodes that proceeded the formation of flowers. This is recorded in table IV.

TABLE IV

NUMBER OF VEGETATIVE NODES FORMED BY SALVIA BEFORE FLOWERING AT 20° C. AND 16 HOUR LIGHT.

Flowers after	5	vegetative nodes	9	plants
»	6	»	54	»
»	7	»	0	»
		Total	63	»

Percentage flowering after 6 vegetative nodes = 86 %.

After three months of growth at 20° C. the plants which were kept in 8 hour days produced only one flower bud. Discounting non-uniform plants caused by the edge effect around the boxes, this represents a proportion of 1 /40.

Conclusion.

Salvia spendens as grown above at 20° C. behaves as a plant that flowers preferentially in 16 hour days rather than in 8 hour days. Some evidence (one plant) was obtained of the plant' s ability to flower after growing for 16 weeks in 8 hour days.

Experiments on the flowering of the plants in day lengths from 7 to 24 hours (continuous light).

As the day lengths of 8 and 16 hours had been chosen in an arbitrary manner it was now considered desirable to find out more precisely the effect of variation in day length on the flowering of the plant. Using the separate growth rooms of the phytotron, it was possible to raise batches of plants at the same time in days of varying length.

Method.

The plants were grown in day lengths of 7, 8, 9, 11, 14 and 16 hours. At the same time, another group of plants was kept in continuous light. Measurements were made of the onset of flowering as in the previous experiment, the number of days from sowing until the flowering bud could be distinguished with the naked eye being taken as the measurement of the plant's response to the flower inducing stimulus. In this experiment all

the plants were grown in pots after germination as the boxes are only suitable for short experiments.

TABLE V

STATE OF DEVELOPMENT OF PLANTS IN DIFFERENT DAY LENGTHS MEASURED WHEN 50 % OF THE PLANTS IN EACH TREATMENT HAVE FORMED A FLOWERING BUD.

Hours Day length	Age in days at 50 % flowering	Height at 50 % flowering cms.	Vegetative nodes produced at 50 % flowering
7	∞		
8	110	15.5	14
9	82	15.0	9
11	60	11.8	8
14	62	6.8	7
16	40	4.2	6
24	40	4.1	6

Results.

Table V records the height and average number of vegetative

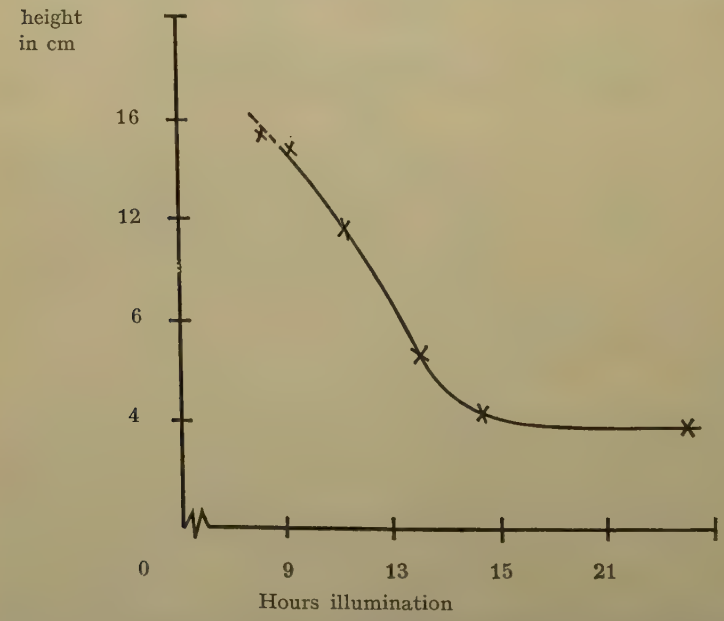


FIG. 4. — Height of plants on flowering when grown in days of varying length.

nodes formed by each group of plants when 50 % of them reach the flowering stage. These data are also illustrated in figs. 3, 4, 5. In order to compare the comparative rates of growth in the different day lengths, table VI records the height of the plants and the number of vegetative nodes formed at the 65th day after sowing. Fig. 6 shows typical examples of these plants at this 65th day.

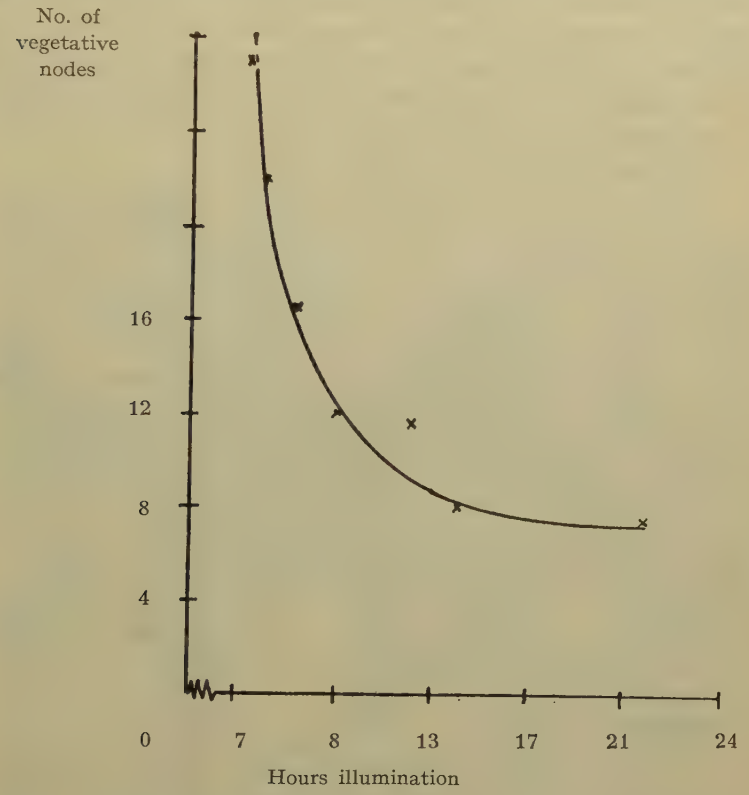


FIG. 5. — Number of vegetative nodes formed on flowering when grown in days of varying length.

Discussion.

At the 65th day the plants grown under the normal long day conditions are well in flower. It is interesting to note the progress the other plants have made at this time. Fig. 6 shows that there is apparently a sharp distinction between the response of the plants to day lengths of 8 and 9 hours. The plants in 7 and 8 hour days although healthy are much smaller than the others,

there being little difference in height between the other treatments. This sharp distinction in vegetative growth is also reflected in the flowering response of the plants. It is seen in fig. 8 that the addition of one hour to the day length makes an enormous difference to the amount of time that the plant requires to come into flower. It was also confirmed in this experiment that the plants kept for 4 months in 8 hour days would flower but after forming on the average 14 vegetative nodes, (fig. 7). Plants kept in 7 hour days for six months never produced a flower, but on transfer to 8 hour days at this age when they had produced 16 to 18 vegetative nodes they produced flowering buds in under three weeks.

TABLE VI

EFFECT OF DIFFERENT DAY LENGTHS ON THE GROWTH AND FLOWERING OF SALVIA AS MEASURED AT THE 65TH DAY AFTER SOWING.

Day length	Height cms.	Vegetative nodes produced	Percentage of population in flower
7	7.3	6	0
8	6.8	7	0
9	10.8	8	0
11	11.8	8	36 %
14	6.8	7	54 %
16	12.5	6*f*	100 %
24 (Continuons light)	11.8	6*f*	100 %

f = plants now in flower, only vegetative nodes preceeding flowering are recorded.

Keeping the plants in continuous light did not have any effect on flowering that was different from that found with plants grown in days with 16 hours of light. In both cases the buds were produced at the same time and after the production of the same number of vegetative nodes.

It would appear, therefore, that growing the plants in day lengths of between 9 and 24 hours (continuous light) the plants reach flowering without undue delay, the optimum day length

FIG. 6. — Examples of plants 65 days after sowing when grown in varying daylengths from 7 to 16 hours.

FIG. 7. — Plants after growing for 120 days in 8 hour days ; 50% of the population is in flower and the plants have on the average 14 vegetative nodes.

being reached at 16 hours of light. This last conclusion can be drawn as the growth and flowering of the plants in 24 hour days is the same as that in 16 hour days. Day lengths of 8 hours or less retarded greatly the production of the flowers as well as the growth in height of the plant. This retardation appears to be sufficient to stop the production of flowers entirely if the plants are kept in days of only 7 hours length.

Conclusion.

Salvia splendens (Sello) var. feu de la Saint Jean is a long day plant. When growing in long days of 16 hours light or more, the plant rapidly produces flowers. Flower production is gradually retarded on reducing the day length. With day lengths of 8 hours flower production is very slow, while with 7 hour days plants remained completely vegetative.

Experiments to find the number of photoinductive cycles necessary to produce flower induction.

Knowing the response of the plants to long and short days, it remained to find out how long the plants had to be kept in the flower inducing conditions before they lost their vegetative state and became reproductive. The definition used in this work is based on the studies of Naylor (1941) on photoperiodic after effect. The definition is, „ that once a plant has received a stimulus sufficient to make it flower, then flowering will take place in the absence of further stimulation ". In the terms of this work on photoperiodism plants once induced to flower in long days will still produce their flowers when transferred to short days.

The work now to be described does differ from the general practice in the manner in which the transfers are made from long to short days. Most authors allow their plants to grow to a considerable size in the non-inducing conditions before exposing them to the flower inducing stimulus. It is also a common practice to keep a clone of vegetative material for such experiments. In such experiments little account is made of the age of the material at the moment at which it receives the photo-induction. The use of a clone can never be free from doubts due to the

ageing of the material which may cause it to respond differently at different times to the same stimulus.

In these experiments the following method is used. It is important to note that the plants are raised from seed.

Method.

Batches of plants are raised in boxes and on germination are placed in the long day conditions of the Phytotron (16 hours light). As soon as the plants are large enough to handle, which is usually once the cotyledons have expanded, they are transferred to pots as usual. These potted plants are now transferred from long to short days at short intervals. Thus, at the end of the experiment there are the control plants, one lot that have been continuously in long days and the other similarly kept in short days. There are also in the short day chambers of the Phytotron the plants that have been transferred there from long days. They will thus be labelled as plants that were kept in long days until their 3, 6, 9, etc. day after germination. At the time the transfer is made, a note is taken of the stage of development of the plant, how many nodes have been produced, height, etc. An example is usually pressed for further reference.

Experiment I. — to find the number of long day inductive cycles necessary to produce flower formation.

In this experiment 8 plants were used in each batch that was transferred from long to short days. The percentage of flowering of each batch is indicated against the time necessary for flowering in table VII. Fig. 8 illustrates the state of flowering of the plants at the 57 th day after germination. It can be seen that the three plants to the right, the short day control and the two tranfers made after 10 and 17 days respectively, show no signs of flowering. The other three plants to the left of the picture are all in flower. These include the long day control and the transfers made after 31 and 25 days. It is evident from this experiment that transfers from long to short days made after the 25th day have little or no effect on the time of flowering of the plants and none at all on the induction of flowering considered on an absolute basis where the time needed to come to

NUMBER OF LONG DAY INDUCTION TREATMENT

57 31 25 17 10 0

long day control short day control

FIG. 8. — Illustration of state of flowering 57 days after germination in plants transferred to short days after 10, 17, 25 and 31 long days. The controls were kept in long and short days respectively throughout the entire experiment.

flower would be disregarded. The age of the plants on flowering is illustrated in fig. 9.

TABLE VII

EXTENT OF FLOWERING IN SALVIA GROWN IN POTS WITH VARYING NUMBERS OF LONG DAY INDUCTIVE CYCLES.

Nr. of long day inductive cycles from germination to transfer to 8 hour days	Age of plants at measurement of flowering (days after sowing)					
	33	34	49	54	61	
0 Short day control	0	0	0	0	0	Percentage
10	0	0	0	0	0	flowering
17	0	0	0	50	50	at above
25	0	0	0	50	100	days.
31	15	68	100	100	100	
57 Long day control continuous induction.	20	89	100	100	100	

On regarding closely, a flowering bud is discernible in the plants from the transfer made at the 17th day after germination. As germination takes 8 days, a treatment of 17 long days is necessary to induce flower production in the plants. With exposures of less than 17 days to long days, the position is less clear. If the plants which had been kept in long days, for only 11 light cycles and then placed in short days, they were found to come into flower gradually at the end of the third month after sowing. This is also what occurs with the short day control plants that have never been exposed to long days. As in this experiment there were not enough plants to enable a distinction to be seen, if indeed it existed, between these two groups of plants, the following experiment was carried out to obtain more precise information on this point.

Experiment II. — to obtain further information on the length of photoinduction necessary to produce flower formation.

In order to have sufficient numbers of plants for comparisons to be possible on the effect of just a few light cycles difference at the critical time of flower induction, the above experiment was repeated the only difference being that the plants were

grown in boxes of 30 plants per box. The method and cultivation of the plants in boxes is described on page 40.

Results.

The time necessary for 50 % of each treatment of plants to produce a flowering bud visible to the naked eye is recorded in table VIII and illustrated in fig. 9. All the transfers in this experiment were made before the 27th day.

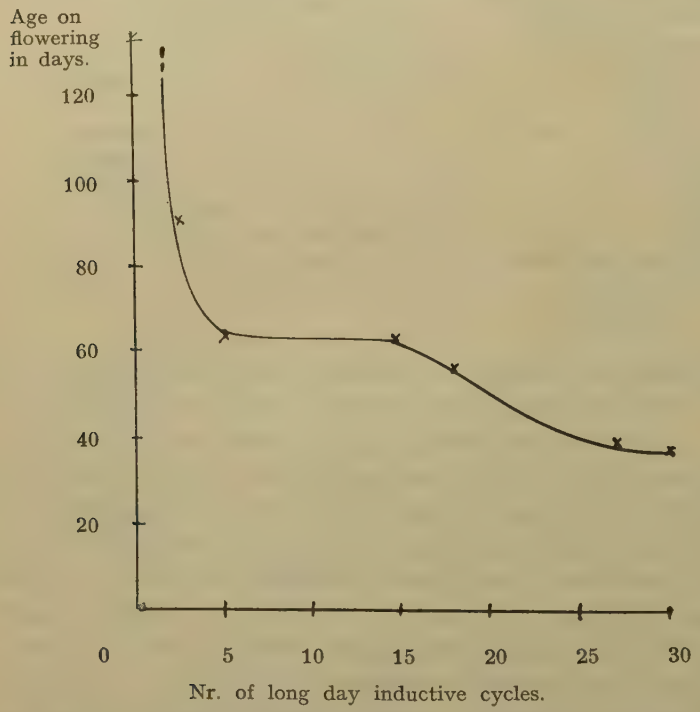


FIG. 9. — Age of plants on flowering after varying lengths of induction treatment.

Discussion.

When the plants were grown in pots, flowering was found to be induced after 25 days. The plants which had received this induction period flowered normally, no bud abortion taking place. On growing the plants in boxes, the controls as shown in table II behaved just as the controls when the plants were grown in pots, (table I). In both cases the plants flowered after 40 days of 16 hours light and the flowers were produced after

FIG. 10. — Flowering buds that have aborted due to an insufficient lenght of flower induction.

(Photo : R. SAUVEUR)

FIG. 11. — Flowering bud developing normally.

the 6th vegetative node. With the pot experiments, the critical time for flower induction seemed to lie just before the 25th day after sowing.

TABLE VIII

EXTENT OF FLOWERING IN SALVIA GROWN IN BOXES WITH VARYING NUMBERS OF LONG DAY INDUCTIVE CYCLES.

Nr. of long day inductive cycles from germination until transfer to 8 hour days	Percentage flowering at given in days from sowing	Remarks
2	2.5 % at 90 days	After 120 days abortion of all flower buds and reversion to vegetative condition.
10	5.0 % at 62 days	
15	5.0 % at 62 days	
18	50.0 % at 54 days	After 69 days abortion of buds and reversion to vegetative condition.
27	50.0 % at 36 days	Normal flowering
Continuous long day induction (control)		
36	50.0 % at 36 days	Normal flowering

However, 26 days seems to be a critical time for plants grown in boxes. 50 % were in flower after 54 days, but by the 69th day all the flower buds had aborted, see figs 10, 11. Induction periods of less than 26 days produced 5 % flowering after 62 days, but this was also followed by the abortion of all the flower buds. All the plants in boxes that had been transferred into the short day regime were kept there for a further 2 months. No flowers were produced except for one plant amongst the short day controls which produced a flowering bud at the age of 90 days.

Conclusions.

When the plants are grown in optimum condition in pots, flowers are clearly induced by the time the plants had reached their 25th day. From Experiment I it is evident that some promotion of flowering can take place before this time, but it

was not enough in the conditions of that experiment for the flowers to bloom properly,

Thus, by the definition on page 51, that plants once induced to flower by a certain stimulus will flower after the removal of this stimulus, the plants of Experiment I cannot be considered to have been properly induced as they dit not properly flower. However, it appears that flower induction has already started at the 10th day, as some promotion of flower formation was made by plants transferred to short days at this time, even although followed by bud abortion.

It could be concluded that Salvia is capable of reacting to the flower promoting stimulus of long days early in its life — between the 10th and the 26th day. Morphologically this is between the cotyledonary stage and the appearance of the third pair of leaves.

It is seen therefore that flower induction leading to the formation of flower primordia has taken place after a treatment of 10 long day inductive cycles. In order that the plants will continue to develop these buds and produce functional flowers, it is necessary that the induction period be extended to at least 26 long day inductive cycles. These findings agree with those of Struckmeyer (1941). This author, working with a short day variety of *Salvia splendens*, found that flower primordia were visible after an induction treatment of 9 cycles, but abortion would occur unless this was continued for a minimum of 17 inductive cycles.

It would appear in these cases that flower induction had partly taken place but was not sufficient for the continued development of the buds. The plants them reverted to the vegetative state.

Plants that had been partly induced to flower and had then reverted to the vegetative state would if kept in short days flower normally after three or four months as the control plants do that are kept all the time in 8 hour days. It seems that if the photoinduction treatment is not sufficient to bring about the acceleration of flowering, then the plants lose the effect of this stimulus and bloom after the length of time that is normally required in short days.

These experiments deal only with the question of reversion to the vegetative state in plants that had reached only a thres-

FIG. 12. — Plants 72 days after sowing ; the flowering stalk has expanded and the plants are in full bloom. This illustrates the state of development of the material at the beginning of the experiment on the reversion of flowering.

hold state in flower induction. The question now arises ; do plants that have been fully induced and have been brought to full bloom in long days revert to the vegetative state on returning them to short days ?

Experiment on the reversion of flowering in Salvia splendens in plants brought to full bloom with extension of the flowering stalk.

Method.

Plants were raised as usual in pots in 16 hour days until their 72nd day after sowing. By this time the entire population of plants was well in flower. Typical examples are shown in fig. 12. The plants were now divided at random into two groups. One group was replaced in the 16 hour days, and the other was placed in 7 hour days. It was necessary to place the latter group in 7 hour days and not in 8 hour days as it had been previously seen that it was only the 7 hour day that was completely ineffective in inducing flower production. Apart from these differences, in the hours of lighting, the plants were treated identically being kept in similarly conditioned chambers of the phytotron.

Results.

The plants kept in the 16 hour days continued to bloom normally. By the time the plants were 5 months old, the original flowering stalk from the terminal bud had been lost but the axillary buds had developed and produced the flowering shoots.

With the plants kept in 7 hour days, the apical bud in the flowering stalk aborted. The axillary buds then developed and did produce a few flowers before the buds again aborted. A further set of axillary buds then developed but these produced mainly leaves. In some branches a small bud with some flower primordia was formed but this soon withered and died. The 16 hour plants still flower vigorously althrough they have lost many leaves.

Conclusion.

Salvia splendens var. feu de la Saint Jean will revert to the

vegetative state after flowering in long days if it is placed in short days of 7 hours in length.

This reversion took place in plants that were fully in flower and where the terminal flowering stalk had already completed most of its growth.

The effect of the interruption of the night on Flowering in salvia.

It has long been known for many plants that it is the length of the night which is the controlling factor in determining the reaction of the plant to day length (Hamner 1940). The control of flowering by this method has many advantages in the construction of experiments. With some plants a day of 9 hours will keep them entirely vegetative whereas a day of 7 hours with a further period of illumination of 2 hours light in the middle of the night results in flowering (see Bünning 1953). The plants although they have received the same total amount of light energy react in two entirely different ways.

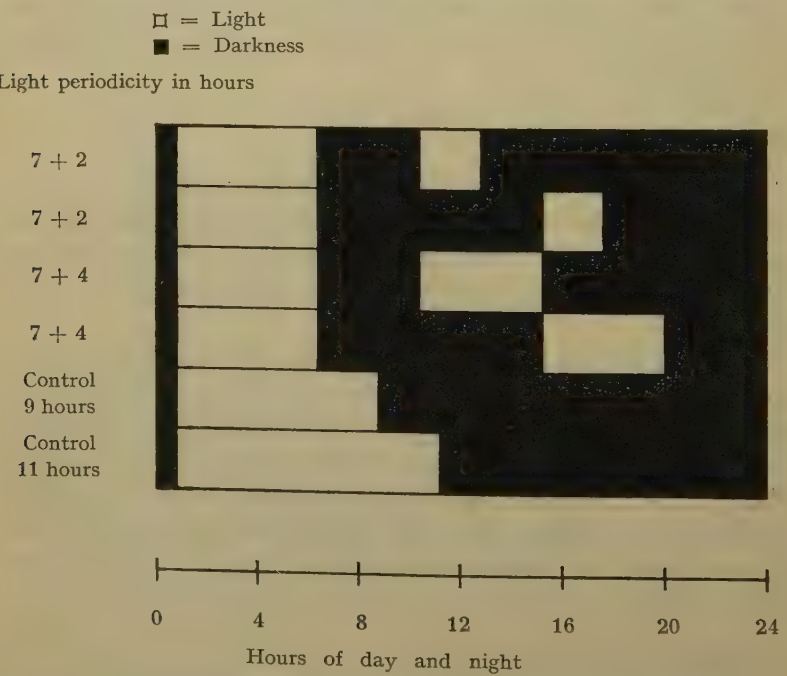


Fig. 13. — Pattern of lighting throughout the 24 hours of day and night in the experiments on the effect of the interruption of the night on flowering.

Experiments of this type were carried out with Salvia, in an attempt to have some way of controlling the flowering of the plant in which it was only the distribution of the hours of lighting throughout the 24 hour cycle which determined the flowering or not of the plant and not the total number of hours of light which has been the case in all the experiments described up to now. Bünning (1950) has shown that the moment at which this light break is given has a profound effect on the flowering of the plant. Therefore, in these experiments the interrupting light was given just after the beginning of the night as well as in the middle.

Methods.

In these experiments 4 different light treatments were given with interruption of the night. The pattern of lighting throughout the 24 hours is slown in fig. 13. The experiments can be considered in two parts. In one part the total amount of light hours given is 9, and in the other part the total is 11. Except for the control plants which receive 9 and 11 hours light respectively all at one time, the plants have an initial day length of 7 hours. In the first group two hours supplementary lighting is given during the night, while in the other the night illumination lasts 4 hours. When the interruption of the darkness is made at the beginning of the night, the lights are turned on in every case 3 hours after the end of the initial illumination period of 7 hours. When the interruption is carried out in the middle of the night, there is a period of 7 hours darkness between the end of the initial day lighting of 7 hours and the beginning of the night illumination. This is the same whether the night illumination be for 2 or 4 hours.

The plants are sown and allowed to germinate in boxes as usual. As soon as the first signs of germination are seen, the boxes are placed in the different light treatments described above. As soon as the plants are old enough to be handled, i. e. once the cotyledons are expanded, they are transplanted to the usual 6 cms pots.

TABLE IX

EFFECT OF THE INTERRUPTION OF THE NIGHT ON THE GROWTH AND FLOWERING OF SALVIA MEASURED AT THE 65TH DAY AFTER SOWING.

Length of day hours	Time of interruption	Length of interrupting light in hours	Height of plant	Vegetative nodes produced	Percentage in flower
7	beginning of night	2	9.8 cms.	8	7
7	middle of night	2	10.4 »	8	0
7	beginning of night	4	10.5 »	8	85
7	middle of night	4	11.4 »	8	54
Controls					
9	–	–	10.8	8	0
11	–	–	11.8 »	8	36

Results.

The progress of the plants in height, vegetative nodes formed and flowering after 65 days is recorded in table IX. A summary table showing the age of the plants when 50 % of them had reached flowering is shown in table X. It will be seen that the differences between the treatments of 9 hours light all at one time and 7 hours day with 2 hours later in the night are very slight. The height of the plants is the same, the number of nodes which precede flowering is the same, and the moment of onset of flowering is not changed by the treatment. Whether the night was interrupted near the beginning or in the middle has had no noticeable effect on the plants.

All that has been said above for the 9 hour and 7 hour with 2 hours supplementary light experiments can also be said for the plants that were grown using a total of 11 hours light. Here the plants which received their light in one continuous illumination of 11 hours cannot be distinguished from the plants that received a basic day length of 7 hours and a supplementary lighting in the night of 4 hours. This is also true whether the supplementary light was given at the beginning or in the middle of the night. The various groups of plants in vegetative growth are illustrated in figs. 14, 15 and 16. Here the

7 + 4	7 + 4	11	hours illumination
interruption at beginning of night	interruption at middle of night	control	

Fig. 14. — Plants 61 days old grown with an interruption of 4 hours during the night given at different moments during the night and also a control grown in 11 hour days without any interruption of the night. These plants are on the point of coming into flower.

Fig. 15. — To the left plants grown in 7 hour days with a 2 hour interruption of the night and to the right the control plants from 9 hour days ; plants photographed at the 49th day after sowing.

FIG. 16. — To the left plants grown in 7 hour days with a 2 hour interruption of the night and to the right the control plants from 9 hour days ; plants photographed at an age of 94 days.

TABLE X

STATE OF DEVELOPMENT OF PLANTS TREATED WITH VARYING INTERRUPTIONS OF THE NIGHT MEASURED WHEN 50 % OF THE PLANTS IN EACH TREATMENT HAVE FORMED A FLOWERING BUD.

Length of day hours	Time of interruption	Length of interrupting light in hours	Age in days at 50 % flowering	Height cms.	Vegetative nodes produced
7	beginning of night	2	89	7.8	9
7	middle of night	2	92	8.0	9
7	beginning of night	4	60	9.8	8
7	middle of night	4	64	11.2	8
Controls					
9	–	–	89	7.8	9
11	–	–	60	11.8	8

uniformity of the growth of the plants whatever the distribution of the lighting is clearly seen.

In fig. 16 plants are shown that have reached flowering. In both cases with and without a light break the amount of flower and leaf production is the same.

Discussion.

In interpreting the results of these experiments, it is necessary to refer to the earlier experiment on the effect of day length on the flowering of the plants, (see page 50). There it was shown that the day length could not be longer than 7 hours for the plants to remain vegetative indefinitely. In all these experiments, the total day length with supplementary lighting in the night was never less than 9 hours. It had also been shown in the section dealing with day length and flowering that a day of 9 hours light could induce flowering relatively rapidly when compared with the time taken by plants in 8 hour days to come into flower.

In order to have a positive result for this kind of experiment in the light of the information now available from these last experiments, it would appear to be necessary to grow the plants

in a basic length of 5 hour days and give a supplementary lighting of two hours during the night. In this way the total hours of illumination would not exceed the total of 7 which is the maximum allowed if the plants are to remain vegetative. It is possible that the redistribution of these 7 hours as described above could induce the plant to flower. This expectation is based on the findings of the section on day length, (page 50), and on the theory of Bunning on flower initiation.

Conclusions.

A day length of 9 hours which will bring the plants to flower in about 80 to 90 days cannot be bettered for rapidity of flower production or growth of the plant by giving the same total of light hours with 7 of them during the day and 2 interrupting the night. The same is true for plants grown in 11 hour days where a similar redistribution of the hours of illumination still brings the plants to flower in the same time, after about 60 days. It is possible that this negative finding is due to the period of illumination (day plus night break) being too long. When this is the case no further stimulation would be observed as the plants would have already reacted to the flower inducing stimulus.

The effect of temperature on growth and flowering.

The object of the following experiments was to find out if the photoperiodic reaction of this variety of *Salvia splendens* was altered by changing the temperature of its environment. That the effect of the light stimulus could be modified or even replaced by temperature treatments has been known since the early work of Curtis and Chang (1930). Struckmeyer has also shown using another variety of *Salvia splendens* that a change in temperature could completely alter the photoperiodic reaction of the plant, (see historical review page 20).

In addition to observing the effect of temperature on the flowering of the plant from a qualitative point of view, observations are also made of growth rate, the amount of vegetative development and the time taken for flowering.

Methods.

The plants were grown in pots as described in the section on cultivation. For these experiments, the small independently regulated chambers of the Phytotron were used. These rooms are equipped with thermostatic clocks, which enable an automatic temperature change to be made once every hour. For a description of these growth rooms and their uses, see Bouillenne (1958). Thus, in these experiments the plants were never moved from one chamber to another, but always remained in the same growth room. All the temperature treatments were started at the moment of germination, i. e. 8 days after sowing.

Watering was carried out each day with water stored at the temperature of the growth room. In experiments I and II using constant temperature day and night, 20° C. in experiment I and 27°C. in experiment II, measurements of growth were made each time from one plant selected to represent the mean of the population. In each experiment between 150 and 200 plants were used.

In experiments III and IV in which day and night temperature fluctuations were employed, each time the growth of the plants was recorded 10 plants were selected at random for the measurements. The final results shown in the tables are the averages of the observations made from these selected plants.

In all four experiments, flowering was measured from the entire quantity of plants used in the experiment. The percentage flowering is calculated as previously described on page 45. The same batch of seed was used in all four experiments. Experiments I and II were carried out simultaneously between December and February (1957-58). Experiments III and IV, due to practical difficulties in co-ordinating the lighting and temperature changes, had to becarried out consecutively. As a check on any possible differences due to the different time of year at which the experiments were carried out, experiment I was repeated at the same time as the last temperature fluctuation experiment, i. e. No. IV. In experiments I and II, the constant day and night temperature experiments at 20 and 27°C., the effect of 8 and 16 hour days was combined with the temperature treatment. In experiments III and IV, only 16 hour days were used.

Results.

Experiment I. The growth, development and flowering of Salvia at 20° C. in day lengths of 8 and 16 hours.

The data used here are the same as that which were used in the experiments on the effect of day length on flowering. The results are included again in table XI for comparison with those obtained in the other temperature treatments. The repeat of this experiment at the same time as No. IV yielded the same result, the plants flowering after the same time and after producing the same number of vegetative nodes. As no difference was found between the original experiment and the repeat in May, the following comparisons with the other expriments that were carried out at different times are considered valid. The results of the repeat experiment are shown in table I.

Experiment II. The growth, development and flowering of Salvia at 27° C. in day lengths of 8 and 16 hours.

Growth rate and vegetative node production are recorded in table XI. The flowering of the plants is recorded in table XII. In figs. 17 and 18, the growth rates are recorded of the plants in 8 and 16 hour days grown at 20 and 27° C.

Experiments III and IV.

Comparing the growth rates of Salvia in 16 hour days with —

a) day temperatures of 20° C and night temperatures of 27° C.

b) day temperatures of 27° C and night temperatures of 20° C.

The growth rate of the two treatments are recorded in table XIII, and illustrated in fig. 19. Flowering is recorded in table XII.

The temperature changes in these experiments were never abrupt. The change of 7° C took approximately one hour. In all cases the temperature changes were carried out before the beginning or after the end of the illumination period. Therefore, the night consisted of 6 hours at a constant temperature and two hours of temperature change, i.e. one hour with the temperature rising and one hour with it falling.

The number of days required for the plants of all four expe-

TABLE XI

COMPARISON OF GROWTH AND FLOWERING OF SALVIA IN 8 AND 16 HOUR DAYS AT 20° C AND 27° C, IN BOTH TREATMENTS THE TEMPERATURES BEING MAINTAINED CONSTANTLY DAY AND NIGHT.

Age in Days	20° C.				Age in days	27° C.			
	16 hour days		8 hour days			16 hour days		8 hour days	
	cms. height	no. of nodes	cms. height	no. of nodes		cms. height	no. of nodes	cms. height	no. of nodes
18	0.6	2	0.7	2	12	0.8	1	0.8	1
24	1.6	3	1.3	2	18	1.3	3	1.5	2
33	2.8	5	2.4	4	22	1.8	3	2.7	3
40	4.4	6 (F)	4.3	5	30	3.1	6	3.3	4
47	8.2	6 (F)	5.0	6	37	4.6	8	4.0	5
54	12.8	6 (F)	7.0	7	44	5.7	8 (F)	5.3	7
61	17.2	6 (F)	11.3	8	53	12.0	8 (F)	6.4	8
76	23.0	6 (F)	12.5	11	60	17.2	8 (F)	9.4	10

F = plant now in flower. Only vegetative nodes preceeding flowering are recorded.

TABLE XII

COMPARISON OF STATE OF DEVELOPMENT OF SALVIA PLANTS GROWN IN 16 HOUR DAYS ON 50 % OF THE PLANTS IN EACH TREATMENT COMING INTO FLOWER, THE PLANTS HAVING BEEN RAISED AT 20° C AND 27° C MAINTAINED CONSTANTLY DAY AND NIGHT AND 20° C DAY AND 27° C NIGHT AND VICE-VERSA.

	20° C day and night	27° C day and night	20° day and 27° C night	27° C day and 20° C night
Age in days	36	40	49	53
Height	4.6	4.6	6.3	8.6
Vegetative nodes formed	6	8	8	9

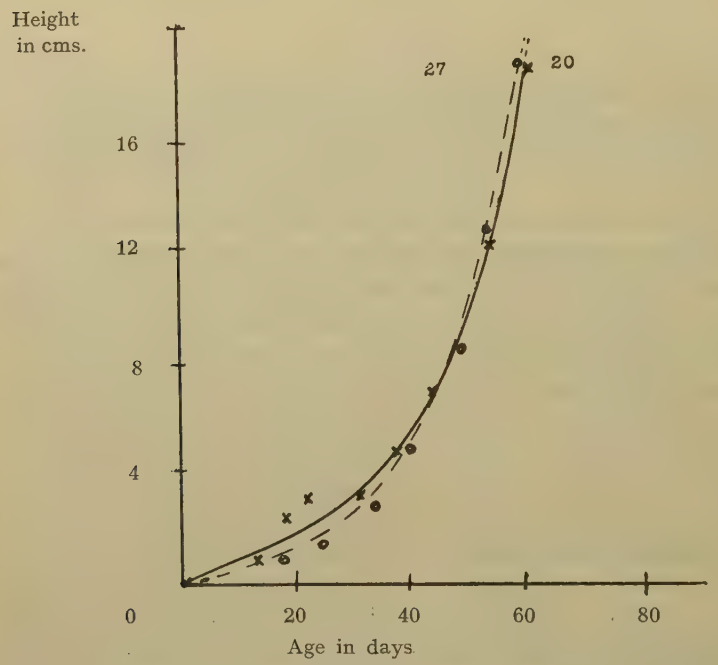


FIG. 17. — Growth in height of Salvia in 16 hour days at 20 and 27 °C.

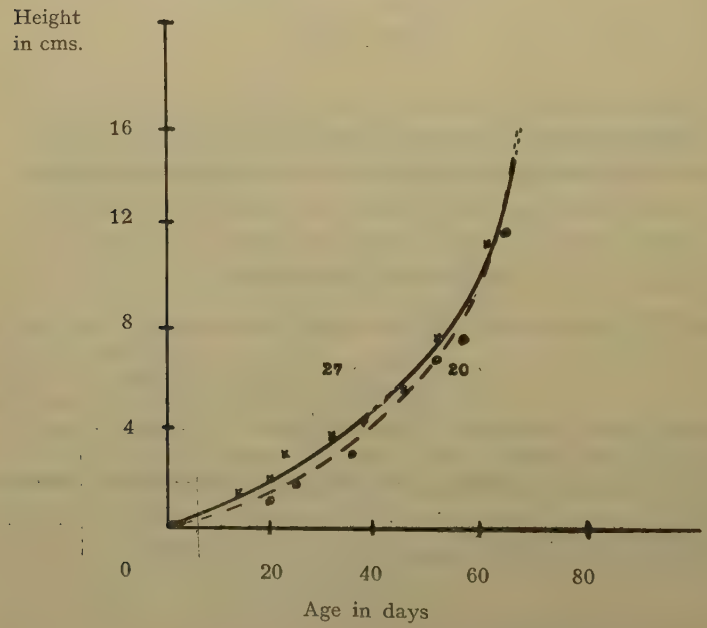


FIG. 18. — Growth in height of Salvia in 8 hour days at 20 and 27 °C.
Height in cm.

TABLE XIII

COMPARISON OF GROWTH AND FLOWERING IN SALVIA PLANTS KEPT AT A DAY TEMPERATURE (16 HOUR DAYS) OF 20° C AND NIGHT TEMPERATURE OF 27° C, WITH THESE PLANTS KEPT AT A DAY TEMPERATURE OF 27° C AND NIGHT TEMPERATURE OF 20° C.

20° C day		27° C night (16 hour days)		27° C day		20° C night	
Age in days	cms. height	No. of nodes	Percentage flowering	Age in days	cms. height	No. of nodes	Percentage flowering
16	0.7	1	0	20	1.5	2	–
23	1.8	3	0	26	2.1	3	–
32	3.4	5	0	33	4.0	5	0
43	6.0	7	9.3	38	5.2	6	0
51	6.3	8*f*	88.0	51	8.6	8	32.0
59	12.2	8*f*	100.0	56	10.8	9*f*	65.0
61	–	–	–	61	12.1	9*f*	100.0

f = plant now in flower, only vegetative nodes preceeding flowering are recorded.

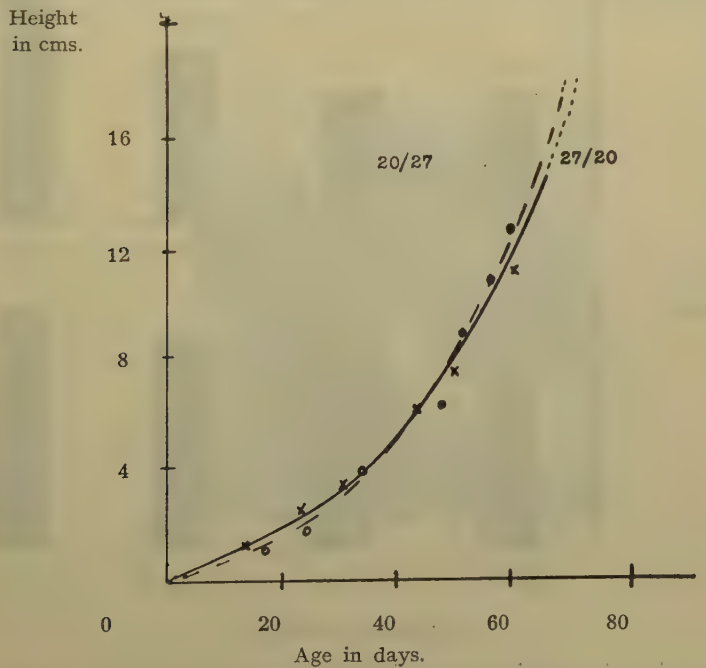


FIG. 19. — Growth in height of Salvia in 16 hour days with day temperature of 20 °C. and night temperature of 27 °C. and vice-versa (27/20 °C.).
Age in days Height in cms. No. of nodes

riments to reach a level of 50 % flowering is shown in table XII. The number of vegetative nodes and the height of the plants at the 50 % flowering stage is also recorded. The results are shown as a histogram in fig. 20, and examples of the plants from all the treatments can be seen in figs. 21, 22, 23, 24, 25.

In all cases growth was vigorous and flowering took its normal course, with the treatment of 27° C constantly maintained day

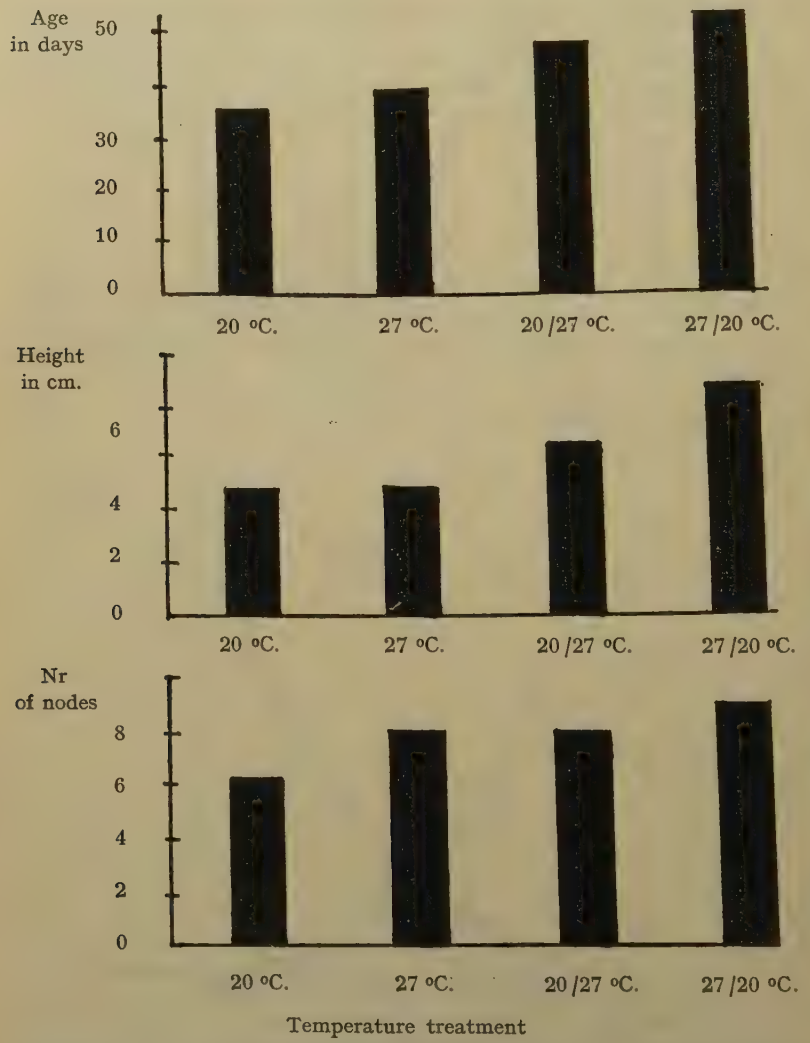


FIG. 20. — Age, height and number of vegetative nodes on flowering with varying temperature treatments.

FIG. 21. — Plant 60 days after sowing grown in 16 hour days at 27 °C. Note the premature shedding of the flowers.

FIG. 22. — Illustration of the vegetative state of Salvia after 60 days when kept at 27 °C. in 8 hour days.

FIG. 23. — Plants 60 days old grown in 16 hour days with a day temperature of 20 °C. and a night temperature of 27 °C.

FIG. 24. — Plants 60 days old flowering in 16 hour days ; on the left plants kept at 20 °C. night and day, on the right plants kept at 27 °C by day and 20 °C. at night.

FIG. 25. — Plants 64 days old grown in 16 hour days with day temperature at 27 °C. and the night temperature at 20 °C.

and night, it was found that as soon as the flowering stalk began to elongate all the flower buds fell from the stalk. The terminal flowering meristem did not abort, but continued to produce these fugacious flowers. This effect of raising the temperature showed itself only when both the day and night temperatures were kept at 27° C.

Discussion.

The overall results of these experiments are best seen in figs. from 21 to 25. It is evident from experiments I and II, that merely raising the temperature of the environment by 7° C has little effect on the growth in height and the time taken to flower by the plants, provided that the day and night temperatures are kept constant. The sole difference arising from the raising of the day and night temperature at the same time is that the number of vegetative nodes at flowering is 8 with plants grown at 27° C and 6 with plants grown at 20° C. The height of the plants being the same in the two cases, the internode length is therefore reduced 25 % at the higher temperature. This agrees with the results of Mitchell (1953) with rye grass *(Lolium perenne)*, where raising the temperature also reduced internode lenght. It could be said that raising the temperature increased the vegetative life of the plant as more leaves were produced before flowering.

This variety of *Salvia splendens* (feu de la Saint Jean) is therefore not like the variety Harbinger used by Struckmeyer (1939), which altered its photoperiodic reaction with temperature, (see page 20).

In treating the plants with temperature fluctuations greater differences were observed in the time required for flowering and in the height of the plants on producing their first flowering buds. The increase in time required for flowering and in the height of the plants at flowering, was most marked in the experiment with warm days and and cool nights (No. IV). There was, however, a similar effect although not so marked in the reverse treatment, cool days and warm nights (No. III). In comparing the growth rates of the plants as plotted in figs. 17 and 18 for the plants grown at constant temperatures and in fig. 19 for the plants treated with temperature fluctuations, it is seen that the growth rate of the plants is the same for all the treatments. The difference in height at flowering therefore is due to the effect

the temperature has in prolonging the vegetative growth of the plants and consequently they are older and taller at the time flowering is reached.

Various authors have examined the effect of temperature on plant flowering, but it is difficult to find any theory that will fit the above findings, as the same result is obtained with two different treatments, (see historical review page 20). Went (1949) has investigated the effect of temperature fluctuations on translocation in tomatoes, and the more favourable conditions for this activity with the temperature fluctuations above might explain the extended vegetative growth of the plant. Again, arguments concerning the relative amounts of photosynthesis versus night respiration cannot explain the results of these experiments for whatever theory will fit experiment III will not explain the obtaining of similar results with a converse treatment as in experiment IV.

Conclusion.

It can only be concluded that it is the temperature change between night and day and in particular the drop of temperature from day to night, that is responsible for prolonging the vegetative life of the plants.

General conclusions on photoperiodism in Salvia.

From the first experiments, where it was noticed that Salvia flowered much more rapidly in 16 hour days than in 8 hour days, it was evident that the plant was preferentially a long day one. Continued observations on the plants kept in 8 hour days showed that they would also flower under these conditions, provided they were given sufficient time. It takes 110 days for 50 % of a population of plants to reach flowering in 8 hour days, whereas in 16 hour days 50 % are in flower after 38 days.

Further experiments using many different day lengths showed that Salvia would remain vegetative indefinitely when kept in days not exceeding 7 hours in length. Plants which had been kept in this day length for 6 months without showing any signs of flowering were brought to flower in 3 weeks on placing them in 8 hour days.

If the plants are kept in 16 hour days for 17 days after they

have germinated, then they will flower even if after this time they are kept entirely in short days of only 8 hours in length. At this stage the plants are at their 25th day after sowing, and have reached their third node, possessing one pair of cotyledons, two pairs of expanded leaves and one pair of expanding leaves. At this stage the plants can be said to be physiologically induced to flower.

If the plants are taken from the long days and placed in short days before they have reached their 25th day after sowing, then only a few of the plants will produce flower buds and these will abort before the plants come properly into flower.

Reversion to the vegetative state can also take place with plants that are fully in flower. If plants that have reached the flowering stage and have opened their flowering buds are placed in short days of 7 hours, then these flower buds and any others that may subsequently be produced will abort and the meristems of the plant will return to leaf production.

No acceleration of flowering could be produced by treating the plants with an interruption of the night after an initial period in 7 hour days. This is probably due to the plants being given a total light treatment (9 hours) that was already adequate for flower induction.

Raising the day and night temperature of the environment made no difference to the age or height of the plants at flowering. The plants subjected to the higher temperature produced two internodes more than the other plants before flowering.

Temperature fluctuations between night and day caused the vegetative life of the plant to be prolonged, the plants being older and taller at flowering.

Although Salvia dœs not remain vegetative indefinitely in 8 hour days, it was decided to keep this length of day for the control condition for vegetative plants as the plants grew more healthily in this day length than with a day of only 7 hours.

It was felt that the difference in the time of flowering between the two treatments, 6 weeks at the 6th node in one and 16 weeks at the 15th node in the other, left a sufficient working margin for the experiments envisaged.

PART II.

The anatomy and development morphology of the apical bud.

These studies on the morphology of the apical bud were found to be necessary for two reasons. Before using the buds in the proposed metabolic studies, it was essential to find out if the tissues that made up the bud were of the same nature in the buds coming from different photoperiodic treatments. It was also necessary to find out when the stem apex responded morphologically to the flowering stimulus. From the section on day length and flowering, it is seen that the plant is physiologically induced to flower production by the time it has reached its 25th day after sowing. The question that arises here is : whether or not the meristem has responded by this time to the flowering stimulus in altering its morphology in any way ? If it does not show any change by this time, how many days are there necessary to reveal the first changes in its structure ?

From the experiments on photoperiodism, it was shown (see page 70) that it was only once the plant had produced its third node that it had reached the stage when it was induced to flower by the long day treatments. Therefore, buds taken from plants that had only produced their first node would be coming from non-induced plants, and buds coming from plants that had produced their 5th node would be coming from plants that were just about to produce their flowering buds. On the basis of this argument, buds were taken from plants that had formed their 1st, 3rd and 5th nodes and the buds were considered as belonging to the following physiological conditions.

(1) 1st node buds — buds whose flower initiation was not completed.
(2) 3rd » » — buds where flower initiation had taken place.
(3) 5th » » — buds initiated to flower and just about to produce flowers.
(4) 6th » » — buds with flowering bracts.

FIG. 26. — Seedlings from which the 1st node buds will be cut.
On the right, a bud as used in the morphology and metabolic studies.

These were the buds chosen from the long day plants for this morphological investigation and also for the subsequent metabolic experiments. Buds of a similar size were also collected from plants growing in 8 hour days as controls for the vegetative condition where no flower induction took place. These were also collected at the 1st, 3rd and 5th node stage.

Techniques.

When the outermost leaves of the buds had reached a length of from 0,4 to 0,6 cm they were removed from the plant by cutting through the immediately inferior node. Thus by cutting through the cotyledonary node, 1st node buds were obtained. Similarly cutting through the 2nd and 4th nodes gave the 3rd and 5th node buds respectively. In this way it was ensured the bud was always cut in exactly the same place with the minimum of damage to the tissue. Fig. 26 show the seedlings from which the 1st node buds are cut and the buds once they have been removed from the plant.

It could be argued that these portions that are taken from the plants are not buds but young leaves. It is very difficult to define where a bud begins and ends. When such young leaves of the same dimensions as are shown in fig. 32 are taken from the 5th node of the plant, then the opposite leaves are folded together and would be termed a bud. For the sake of simplicity in this text it is proposed to call this portion of the plant, with the two youngest leaves and the stem apex between them, the bud.

After collection the buds are placed immediately in the following fixative solution :

Acetic acid	5 parts
Formol	10 »
Ethyl alcohol (abs.)	85 »

The buds in fixative are placed in a desiccator and evacuated for 20 minutes. If on the subsequent readmission of air to the desiccator any of the buds still floated on the fixative solution, evacuation was repeated. The total fixation time given to the buds was two hours. The buds were then placed in muslin sacks and washed overnight in running water. Dehydration followed by the usual method, through alcohol solutions of increasing

concentration, the concentrations being increased at 24 hours intervals.

Dehydration was followed by two periods of 24 hours in toluol. At the end of this time paraffin wax was added at room temperature until the toluol was saturated. 24 hours later, the wax saturated toluol plus buds was transferred in 1″ diameter crucibles and placed in a wax inclusion oven at 56° C. (Melting point of wax used, 52 — 53° C.) As the toluol evaporated, molten wax at 56° C was added to the crucibles. Finally, the meristems are included in paraffin blocks are kept in a refrigerator until utilisation.

Longitudinal sections of the buds were cut at a thickness of 10 μ on a fixed-block-moving-knife microtome.

The slides were then gently warmed until the wax expanded (but not melted) and the water had evaporated. Before proceeding any further, the preparations were left overnight in order that they might be completely dry when the wax was removed. Wax removal and hydration took place by passing the slides through two solutions of toluol and a graded series of alcohols of decreasing concentration and finally placing the slides in distilled water.

Staining.

The sections were stained using haemalum and eosin. The following staining techniques were employed :

a) Mayer' s haemalum

Distilled water	1 litre
Haematoxyline (crist.)	1 gm
Sodium iodate	0,2 gm
Alum (potassium)	50 gm

b) Chlorhydrated alcohol

5 drops of concentrated hydrochloric acid per 100 cc of absolute alcohol.

c) Eosin

Eosin	1 part by weight
Distilled water	100 parts by weight

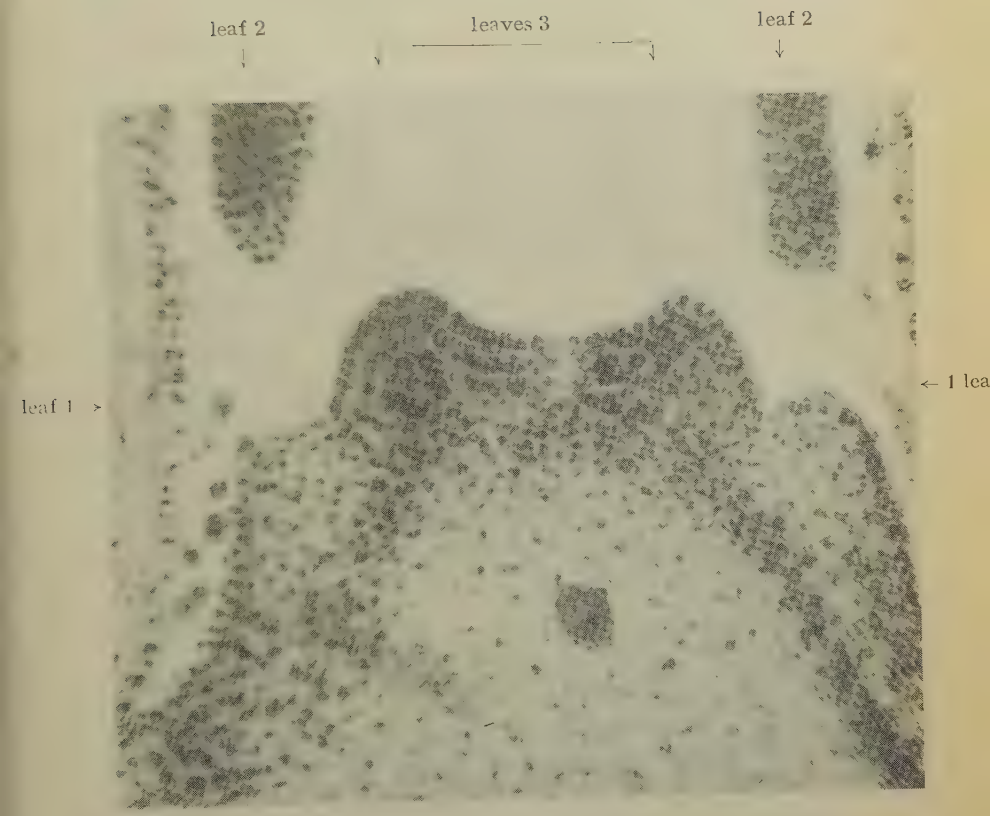


Photo R. Sauveur.

Fig. 27. — Longitudinal section of long day bud from the 1st node, showing the leaves of the 1st, 2nd and 3rd pairs of leaves.

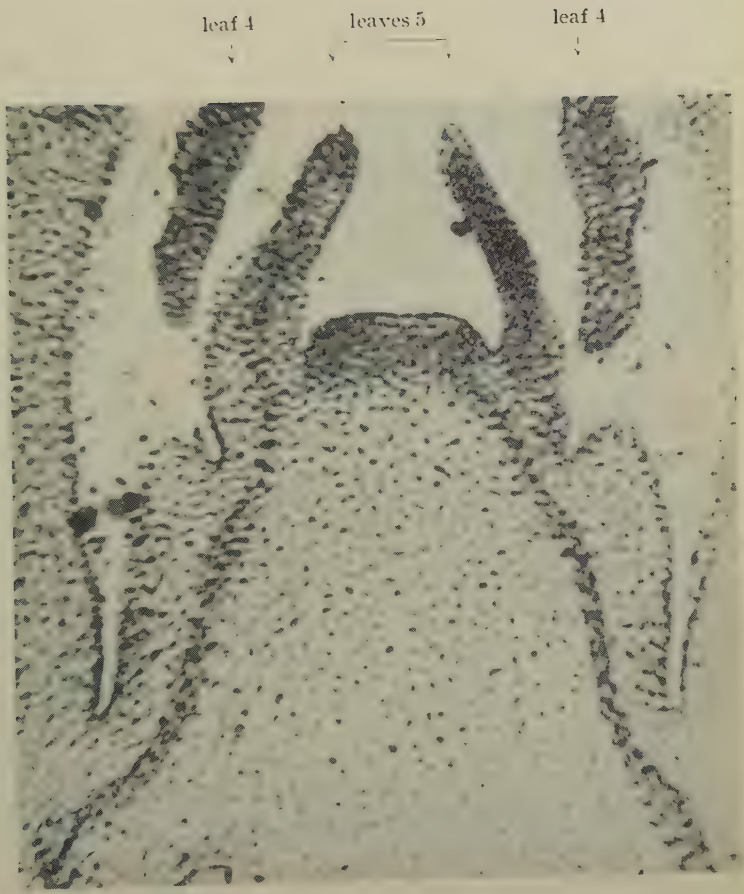


Photo R. Sauveur.

Fig. 28. — Longitudinal section of long day bud from the 3rd node.

Staining times.

1º 5 minutes haemalum
2º Rinse-distilled water
3º Differentiate a few seconds in chlorhydrated alcohol
4º Rinse in tap water until the sections have a purplish tinge. Where the tap water is very soft, some calcium bicarbonate should be added to this rinse as the calcium ions are essential for the proper development of the purple colour in the nuclei.
5º 1 minute eosin.

The sections are then very quickly dehydrated by passing through 70-80-90 and 100 % alcohols allowing about 15 seconds in each alcohol. A second treatment of about 30 seconds is allowed in 100 % alcohol before being transferred to xylol. Two xylol treatments are given, the sections remaining a minimum of 5 minutes in each. Mounting was in canada balsam.

Examination and findings on long day buds.

Ist node bud, illustration fig. 27.

An examination of this figure, which is taken as being typical of this stage, shows three pairs of leaves. The leaves of the first pair enclose the bud and are the pair to whose dimensions reference was made in the section dealing with the collection of the buds (0,4-0,6 cms in length). The second pair, coming from the second node are only seen in partial section as the plant has an opposite and decussate phyllotaxis. Of the third pair only the origins may be seen in the two projections arising from either side of the apical meristem.

The apex shows a clearly distinguishable two cell-deep tunica layer. The corpus is also evident although less easily delimited. Pedunculate glands on the leaf surfaces are another prominent feature. There is no evidence in this illustration or in other sections examined of any axillary meristematic activity.

3rd node bud, fig. 28.

The photograph of a section through a third node bud after induction, does not present many changes in comparison with the previous illustration. The meristem is more flattened but this is no more than might be accounted for by a different stage in growth of a leag initial or a section that was not quite median.

The stalked glands that are found on both surfaces of the oldest leaves included in the illustration (3rd pair) are seen on the younger leaves (4th and 5th pairs) to occur only on the abaxial surfaces. As in the previous figure, no meristematic activity is seen in the leaf axils.

5th node bud, see fig. 29.

In this example of sections through the 5th bud, two striking differences distinguish these buds from the ones previously examined. The first is the very prominent convex shape of the stem apex. A prominence so marked could hardly be due to non-median sections in all the examples illustrated. As the sections are always mounted in series on the slides, any error of interpretation due to this fault is largely avoided. The presence of the phenomenon in all the sections makes it very unlikely that the sections have been taken at moments when the meristem showed an atypical growth form.

The second prominent feature is the axillary buds. They appear to have acquired a special and new tendency in their development.

6th node bud, fig. 30.

It is clearly seen (fig. 30) that the axillary buds that were noted in the sections made from the 5th node buds are in fact the first flower primordia. In fig. 30 the development of the primordia has reached a stage when the beginnings of the formation of the pedicel and corolla can be distinguished. The pedunculate glands noted in the earlier stages of development are less prominent in the young flower bracts than they were in the young leaf initials.

Comparisons between the long day buds.

Looking at the series as a whole, it is seen that only from the 6th node buds and up that the axillary buds are noticed inside the axils of the bract initials. It the section of the 5th node buds, the axillary buds are evident in the axils of the 5th and 6th leaves. The seventh bracts at this stage dœs not seem to show as yet any meristematic activity in their axils (fig. 29).

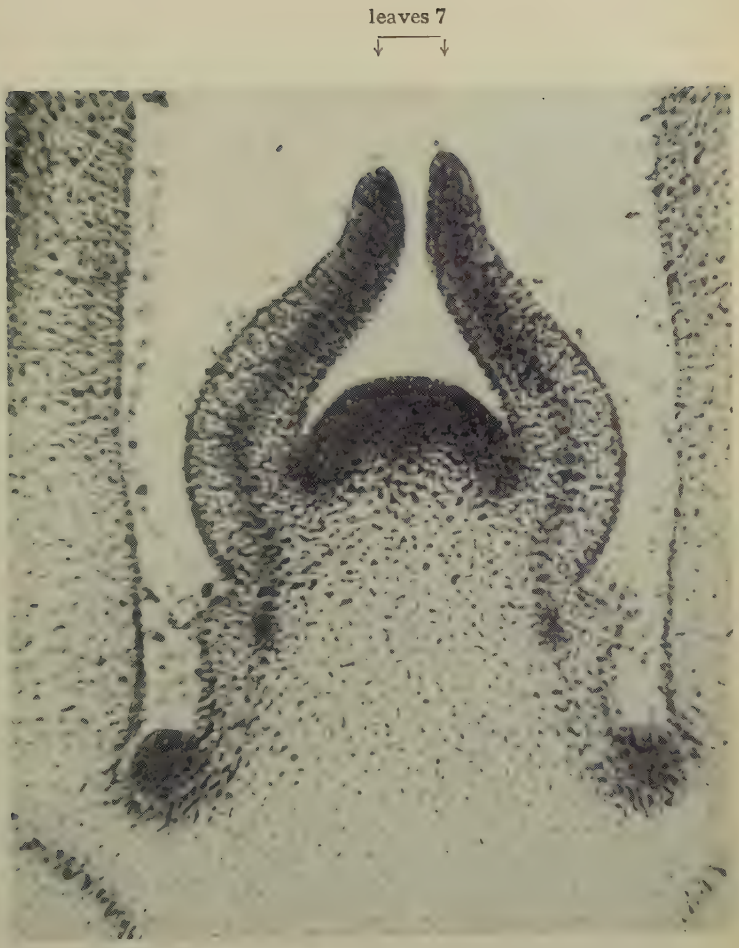


Photo R. Sauveur.

Fig. 29. — Longitudinal section of the 5th node bud from long days ; note the rounding of the apex which is more marked than in the previous figure and the particular importance of the axillary buds.

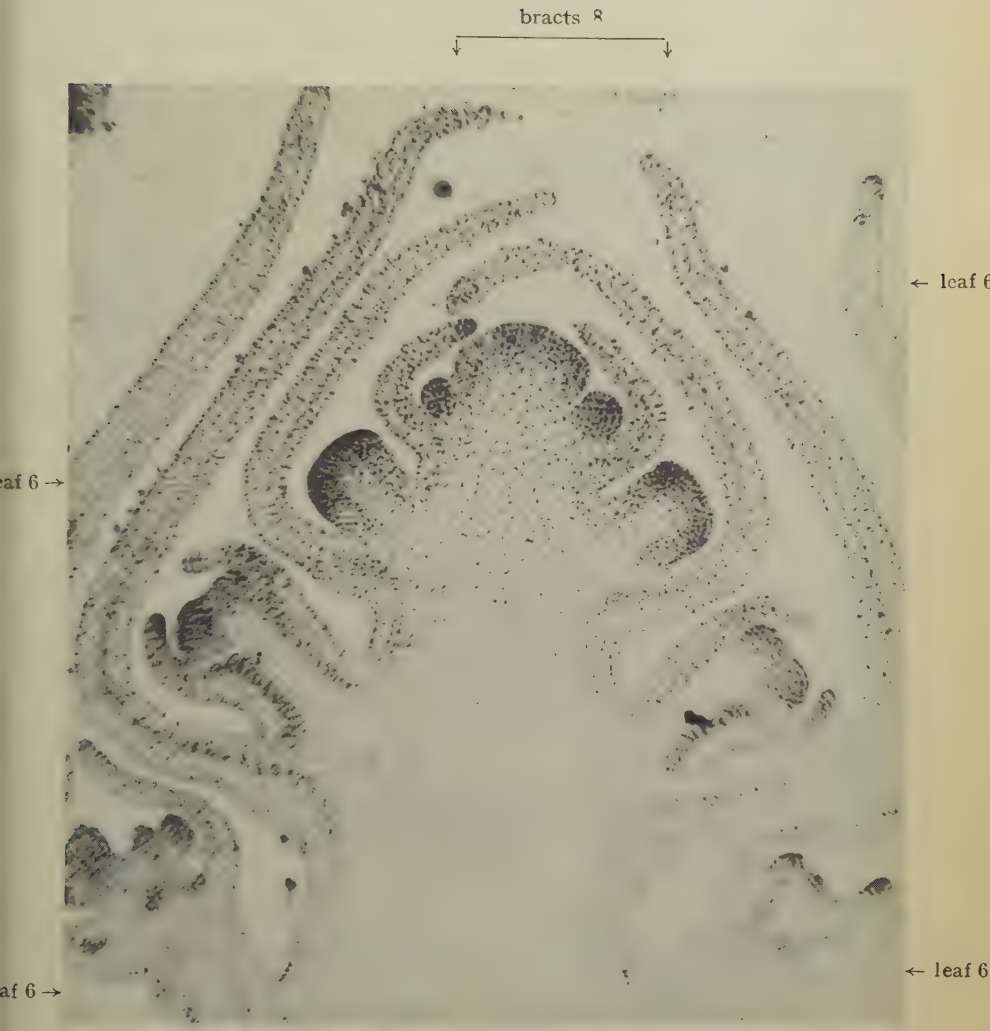


Photo R. Sauveur.

Fig. 30. — Longitudinal section of long day bud from the 6th node showing the formation of flower primordia and bracts.

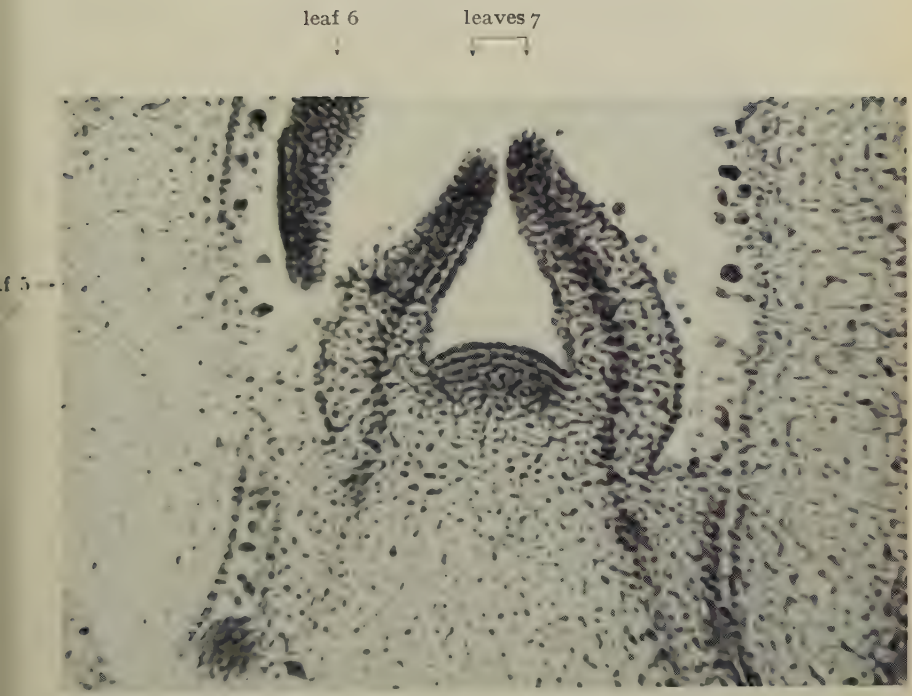


Photo R. Sauveur.

Fig. 31. — Longitudinal section of 5th node bud from short days showing slight development of the axillary meristem.

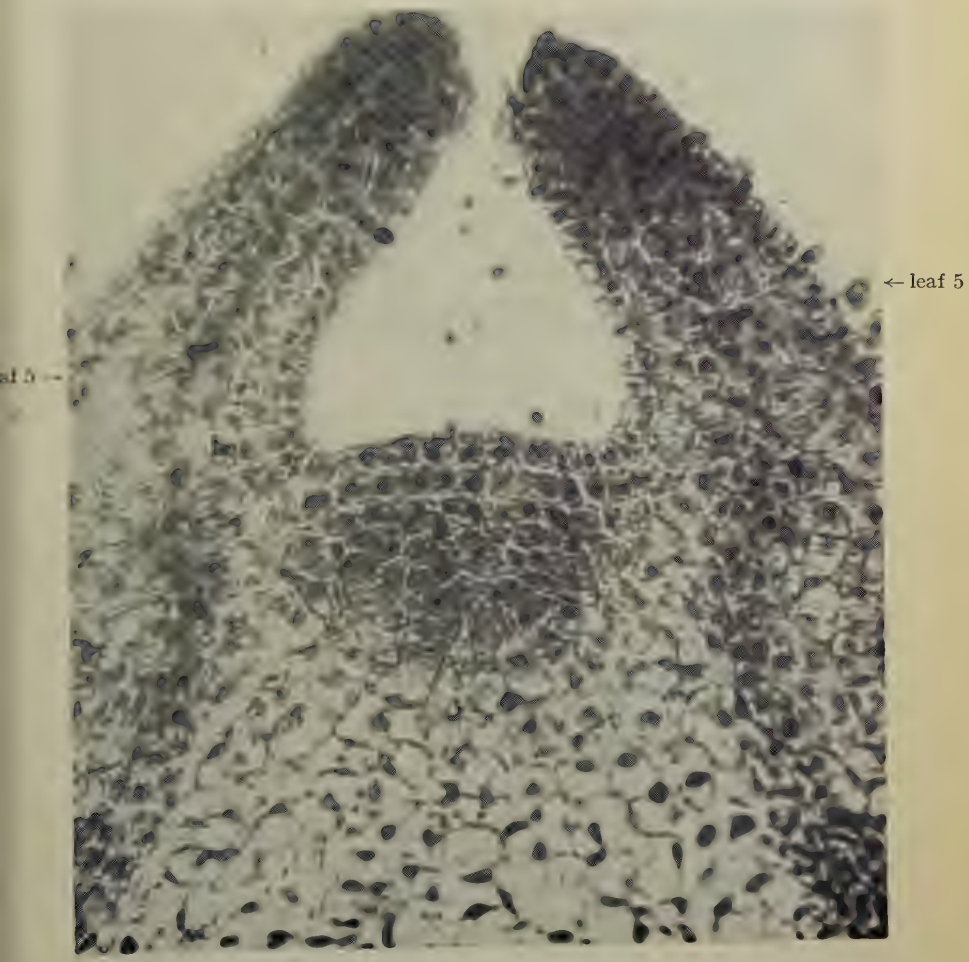


Photo R. Sauveur.

Fig. 32. — Longitudinal section of the meristem of a third node bud grown in short days ; note distinct tunica and corpus.

Examination of short day buds.

Little change is found in the morphology of the short day plants with ageing. A examination of numerous sections failed to show any structures other than those that can be seen in photo 31.

A two cell tunica layer with a distinct corpus region is clearly seen in fig. 32 of a 3rd node short day bud. The shape of the top of the meristem varies from flat in to slightly convex. These are no more than the normal variations that take place with the stages in formation of the leaf initials, (see Buvat, 1955). Only slight meristematic activity is seen in the leaf axils. Many sections of 5th node buds from short days were examined and in none were the axillary buds more evident than they were in fig. 31.

This examination of the short day plants terminated on the plants attaining their 5th node. Subsequently the plants produced no flowers until they had formed their 14th node. It could therefore be considered that these illustrations are all typical of the vegetative meristem of Salvia.

Discussion.

The object of these morphological studies was to find out when the stem apex responded in its development to the flowering stimulus. From the photoperiodism experiments where the growth and flowering of the plants had been observed for extended periods lasting up to 6 months, it was known that this variety of Salvia splendens had to be kept for at least 3 months in 8 hour days before anything other than vegetative plants could be found. Plants of this age would have produced 14 to 15 nodes.

The buds taken for sectioning were collected on a morphological scale. This method of collection was described on page 73. It was chosen as it represented the only pratical method of collection which would yield buds from long and short days which could be compared. If the buds had been collected after the same number of days growth in long and short days, they would be at different stages in their development and comparison would be impossible. Table III shows the time taken for buds to reach

the different stages at which they were investigated in long and short days, as collected in these experiments and also for the experiments on metabolism described later in this work.

It will be noted if these figures are compared with those given for the time necessary for flowering in table in the photoperiodic experiments, that there is an apparent discrepancy in the results. In the latter experiments, all the plants can be expected to be in flower in 40 days. The results in table III show only the attainment of the 5th node after 43 days. This discrepancy is presumably due to the removal of many plants from the boxes for the respiration measurements and for section making.

When the buds are being collected for these purposes, it is always the more uniform plants that are selected. In general, such plants are the most advanced plants to be found in a box. As this operation is repeated several times per box, at the first and third node stages, it will explain why the 5th node in long days is gained after 43 days, when the plants should normally be expected to be in flower having produced its 6th node. When the plants are not thus selected the 5th node appears between the 33rd and 37th days, (see table III), less than a week before flowering. This removal of the most advanced plants still leaves behind in the boxes plants that are quite unimpaired in their flower induction. The plants left in boxes so treated will produce flowers in less than a week after the appearance of the 5th node.

From the above results, it would therefore seem justifiable in taking as vegetative the apices of all the short day buds examined, as these plants have been found to remain vegetative for a least two to three months after the collection of material for the metabolism experiments and section making.

The long day buds produced when the plants had reached the 5th node stage show clearly signs of profound morphological change, rounded apices and marked axillary meristematic activity being the two most prominent features. Sections taken from younger buds in long days, either from the 1st or 3rd node, show no such striking modifications. These buds as well as all the buds examined from short day plants belong to one morphological type, the vegetative apex. This is the type of apical meristem described by Buvat (1955), Millington and Fisk (1956), Struckmeyer (1941), and others. For details, see the historical review page 15. In this condition the shape of the meristem shows

an alternating pattern of a flat or convex form depending on the stage of development of the leaf initials. This variation in form is never seen in the reproductive apex, where the very rounded convex form is always dominant.

Thus on the long day treated plants it is between the 3rd and the 5th nodes that the flowering stimulus first shows itself morphologically. This is between the 30th and the 43rd day after sowing. In the photoperiodic experiments however, it is shown that by the time the plants had attained their 3rd node, they had been induced to flower. Therefore it is between the 1st and the 3rd nodes that the flowering stimulus was perceived by the plant and carried out its effect of altering the subsequent development.

These results show that in this variety of *Salvia splendens* the condition of being induced to flower that can be brought about by a certain known time in long days is not accompanied by any morphological change in the stem apex. It is only 3 weeks later, about a week before the flower bud can be detected with the naked eye, that the flower primordia are laid down, as seen by the microscope on the 5th node or perhaps already on the 4th one.

From these sections and from other growth experiments, it was also observed that as the terminal flowering bud appeared so did the axillary buds in the axils of the higher leaves (from the 4th and 5th nodes) show themselves to the naked eye. Whether these buds contain flower primordia or not at the moment of their apparition is not known, but as soon as the terminal bud has completed its growth these axillary buds produce new flowering shoots. Plants which had been kept in flower for 4 months in the phytotron lost all appearance of having had a single flower so many were the ramifications produced by the axillary flowering branches. The terminal buds were never pinched out in the plants.

In the description of the sections cut from the 5th and 6th node buds, attention was drawn to the marked way in which all the axillary meristems were activated in a rapid acropetalous succession. This, along with the above microscopical observations would suggest that at the moment when the flower primordia begin to develop there is a general activation of the axillary meristems other than just those that contribute to immediate flower formation.

The microscopical examination of the buds shows that only when the plants have attained their 5th node in long days, are there any signs of flower formation. All the other buds examined in both long and short day growing conditions are of the vegetative type. It is subsequently seen by comparing this examination of the buds with the results obtained from the photoperiodic experiments, that induction to flower as physiologically determined in these growing experiments is not accompanied by morphological change. In view of these results, it would appear that an appropriate moment for the investigation of the metabolic activities of the bud would be at an early stage in their growth. It is considered therefore that buds produced by the plants before they have reached the 3rd node stage would be of the greatest interest as at this time the plants are still similar in their morphology which means that tissues are available that can be compared. The course of development of the long and short day plants nevertheless has already been altered by the long day treatment.

There is evidence also that flowering is accompanied by the activation of the inferior axillary meristems, other than those that contribute to the formation of the terminal flowering bud.

Findings and conclusions of parts I and II.

The purpose of these precedings experiments has been to obtain a knowledge of the growth and flowering of a suitable plant for a series of experiments on the metabolism of the apical bud. Before the experiments could be designed, a preliminary knowledge was necessary of the conditions that make the plant flower and under precisely what circumstances of age and environment the plant will react to these conditions.

The findings are as follows :

1° When grown at 20° C and 80 % relative humidity, Salvia plants will flower in 6 weeks after producing 6 nodes. If the plants are kept in days of only 7 hours in length then they will remain vegetative.

2° If the plants are grown in 8 hour days, growth is vigorous and the plants are healthy. In these conditions the plants do not

remain indefinitely vegetative, 50 % of the population will flower after 16 weeks having produced 14 to 15 nodes.

3° With increasing day length, the plants flower more rapidly. The greatest acceleration of flowering takes place on increasing the length of day from 7 to 9 hours.

4° The optimal day lentgh found for flowering was 16 hours. A day length of 24 hours was in no way superior to a day ot 16 hours in bringing the plants quickly to flower.

5° Interrupting the night with two to four hours of illumination had no beneficial effect on the flowering of the plant. This is probably due to the total day length given (9 or 11 hours) being too long and the total amount of light given being too great for a stimulus to be noticed.

6° Plants that are kept in long days until they have produced their 3rd node (25 days after sowing) will flower even if after this time they are kept entirely in days of only 8 hours length. Plants transferred to short days before they have reached this age and stage of development will abort whatever flower buds that are formed and will return to the vegetative state.

7° Plants that are in full flower can be made to return to the vegetative state if they are transferred to days of 7 hours in length.

8° Raising the day and night temperature by 7° C makes no difference to the photoperiodic reaction of the plants or to the age and height of the plant at the moment of the onset of flowering. At the higher temperature 2 more vegetative nodes are produced.

9° When the day and night temperatures fluctuate by an interval of 7° C (from 20 to 27° C) then the vegetative life of the plant is prolonged, the plants being older and taller at flowering and the flowers being produced after a greater number of vegetative nodes.

10° Only when the buds are from the 4th and the 5th node of plants grown in long days are any signs visible to a microscopic examination of the beginning of the formation of flower primordia in the meristem. All other buds from long and short days produced up to this time are of the vegetative type.

11° The flowering of the plants is also accompanied by an activation of the axillary meristems of inferior nodes other than

those that contribute to the formation of the flowers on the terminal flowering bud.

12º Comparing the photoperiodism experiments with the morphological findings, it is seen that the induction of the plant to flower as physiologically determined is not immediately accompanied by any morphological change, but we do not know as yet what could be the cytological modification just after the induction.

* * *

The above findings show that in order to have an absolute distinction between vegetative plants and reproductive ones, it would be necessary to cultivate one group of plants in 7 hour days and in the other in days of at least 16 hours in length. Plants that receive only 7 hours illumination every 24 hours were however found to grow but poorly and without vigour. In order to have healthy plants, it was felt wiser to grow the control vegetative plants in 8 hour days. Under these conditions these plants would flower after 16 weeks. In this way, although the plants grow better absolute distinction between flowering and non-flowering is lost. It is considered, however, that the margin of difference between the long day plants which flower after 6 weeks and the 8 hour plants which only show 50 % flowering after 16 weeks was sufficient to permit the design of experiments on the plant's metabolism in long and short days with regard to flowering, if these experiments were confined to the early weeks of the plant' s growth. It was therefore decided to carry out the experiments on the metabolism of the buds with the material coming from plants classified as in the section on the developmental morphology of the buds (see page 73). In comparing the metabolism of buds from the 1st, 3rd and 5th nodes, it is only in the latter when coming from long day plants that the tissues present will be in any way different morphologically to the others. The amount of change at this stage is, however, very slight and these buds are included in the metabolic comparisons in order to have an idea of the effect of the evolution of the tissue in long and short days.

The buds are classified as follows :

Long day buds.

(1) 1st node buds — where flower initiation has just begun.
(2) 3rd » » — » » » » taken place.
(3) 5th » » — buds initiated to flower and just about to produce flowers.

Short day buds.

(1) 1st node buds — without any flower initiation.
(2) 3rd » » — » » » »
(3) 5th » » — » » » »

The short day buds are taken as controls so that some comparisons can be made between induced and non-induced as well as the effect of ageing in the two day lengths.

PART III.

The respiration of the excised apical buds in relation to photoperiodism.

Respiration being a basic activity of all living things, a change in the development or environmental conditions of the organism is often reflected by a change in its respiratory activities, (Kidd et al. 1921, Bouillenne 1935). It seemed therefore justifiable in taking respiration as a starting point when investigating the facts of photoperiodism and morphology in relation change to possible changes in the metabolism of the buds. It was hoped that these respiratory studies would give an indication of not only the moment at which changes were produced in the physiology of the buds, but also some indication would be obtained ot the kind of change that had been produced.

Methods.

The region taking as representing the bud was decided empirically as the minimum amount of tissue from the stem apex that would have a measurable respiratory activity using the methods available. Respiration was measured in a Warburg respirometer. After some preliminary experiments, it was found that 20 to 25 apical buds containing three pairs of leaf initials and having a length of 0,4 to 0,6 cms., and an average dry weight of 0,37 mgms. would give an average difference reading on the manometers of the Warburg apparatus of 60 mm. per hour. This was a rate that could be measured with reliability.

The buds were cut from the parent plants exactly as in the collection of material for the preparation of microscope sections described on page 73. Immediately after cutting, the buds were placed in the following buffer solution :

Solution A 1/135 M. sodium diphosphate $Na2HPO_4.2H_20$ (11,876 gms/litre).

Solution B 1/140 M. Potassium dihydrogen monophosphate KH_2PO_4 (9,078 gms/litre).

When these solutions were mixed in the proportions of 7 of A to 3 of B, the resulting mixture had a pH of 7,2 which was used in all the following experiments.

The buds were kept in buffer solution until sufficient had been collected for the experiment, usually about 60. In general the preparation of the buds took between 20 and 30 minutes. The buds were then removed from the collection dish and placed on filter paper humidified with the same buffer. They were then divided at random into three lots, two lots of 25 buds for the actual respiration measurements and one lot of 10 buds to be preserved in 50 % alcohol as a record of the buds used in each particular measurement.

Discs of filtrer paper (Whatman N°.40) from which identical central holes had been struck, were fitted into the bases of all the Warburg flasks, including the thermobarometer. The filter paper was then humidified with 0,5 ml. of the buffer solution, and the buds were then placed on this moist paper.

This method of placing the buds in the flasks instead of the more usual one of allowing them to be immersed or floated in 2 to 3 mls of solution was preferred as it would facilitate gas exchange from this type of tissue. When tissues other than unicellular organisms or thin slices are used there is always a danger of false results being obtained as the size of the tissue has hampered the free exchange of gases between the atmosphere and the innermost cells of the piece of tissue concerned. (Denny, 1948).

In general, between 20 and 25 buds were placed in each flask. Every pair of flasks was prepared at the same time and the same number of buds was placed in each vessel. In the centre tube of one flask was placed a lining of filter paper (Whatman N° 40), which was allowed to project beyond the rim of the centre well. In this centre well was now placed 0,3 ml of a 10 % solution of potassium hydroxide. In the centre well of the other flask was placed 0,3 ml distilled water, without any filter paper lining. The thermobarometer was prepared exactly as the latter flask, but without the potassium hydroxide and filter paper. There were also no buds placed in this flask.

The flasks were now attached to the manometers and the whole unit placed in the water bath of the apparatus. The tem-

perature of the water bath was kept thermostatically at 27° C. All the lights were then extinguished and the whole room was kept in darkness until the end ot the experiment. Twenty minutes were allowed for temperature equilibration. The manometer taps were then closed and the apparatus tested for airtightness by withdrawing the fluid in the manometers to the reserve well at the bottom and then raising it to the original position 30 seconds later. If the manometer fluid in both arms returned to the original position it occupied before being withdrawn then the apparatus was considered airtight. The flasks were now allowed to oscillate and the first reading was taken after 5 minutes. This was used as the starting point as some error was always introduced on closing the manometer taps. All subsequent readings were taken at 20 minute intervals. The sides of the water bath being solid, the manometers could be read by torchlight without illuminating the flasks. In general the experiments were not run for more than a total of 125 minutes. Calculation of the results was as described by Umbreit et al (1957). After the results were calculated, a graph was drawn representing the course of oxygen and carbon dioxide exchange throughout the experiment. From this graph (for example see fig. 33) was taken a period of uniform

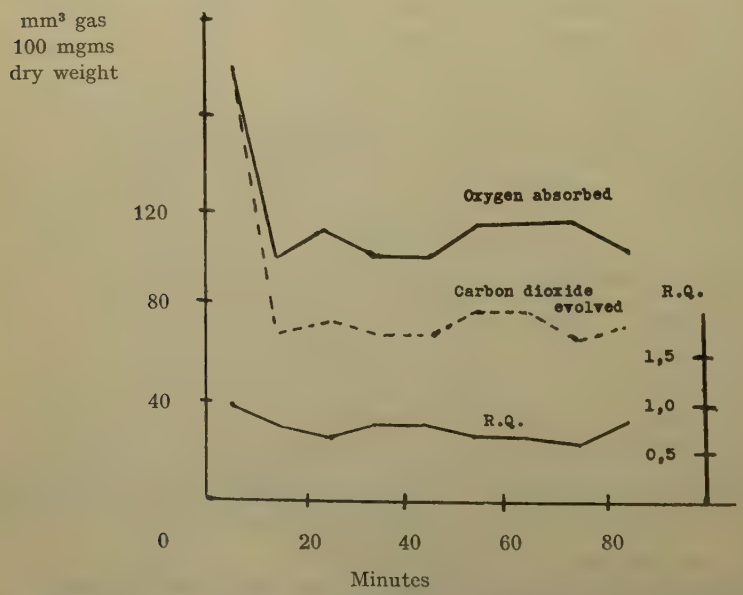


FIG. 33. — Course of oxygen uptake and carbon dioxide evolution showing the conduction of a typical experiment with the Warburg respirometer.

FIG. 34. — Dixon-Keilin flask for measuring respiratory quotients (see text for description) (figure taken from Umbreit et al., 1957).

activity of the buds. In nearly every case this was taken from the 25th to the 85th minute. Plotting the graph showed up any errors that were due to slowness of equilibration and this led in some cases in taking the uniform hour period from the 35th of the 95th minute. Experiments where the respiration of the buds was measured over extended periods lasting up to 4 hours (see page 91) showed that although respiratory activity fell with time the fall was so slight that little error would be introduced if the activity of the buds respiration was always taken from this first uniform hour.

The use of a phosphate buffer entails the making of corrections when calculating the amount of carbon dioxide evolved, as a considerable proportion of the respiratory carbon dioxide is fixed in the phosphate of the buffer.

Two possible methods are available for correcting this error.

The first to be considered is the practical method of Dixon, (see Dixon 1952). In this method a special respirometer flask is used which enables the potassium hydroxide solution for absorbing the carbon dioxide to be added at any desired moment before, during or after the experiment. An illustration of a Dixon flask is seen in fig. 34. When tap (B_1) is opened a glass rod previously placed in the centre well (B) falls down into the reservoir below the flask and displaces the alkali solution which is kept there. On displacement the solution rises into the centre well of the flask and is absorbed by the filter paper lining placed there, just as in the Warburg flasks used in the measurement of oxygen uptake. It is thus possible in one flask to mesure directly the uptake of oxygen and the output of carbon dioxide in the same tissue. By placing 0,5 ml of trichloacetic acid in the side (A) arm at a concentration sufficient to give a final concentration in the flask of 7 %, the buds could be killed and a correction could be made for the amount of carbon dioxide fixed or retained in the tissue. The liberation of fixed carbon dioxide was always carried out in duplicate. In one flask the acid is added at the beginning of the experiment in order of find out the amount of carbon dioxide that is initially present in the tissue in a fixed form. In the other flask the trichloracetic acid is added at the end of the experiment and by subtracting the initial from the final value of a measure is obtained of the carbon dioxide fixed in the tissue and in the buffer solution during the period of respiration.

It was found in such an experiment that the true value for the respiratory quotient after correction has been made for the fixation of carbon dioxide is 16,7 % higher than the value that is obtained when no such correction is made.

The second method that is available for the calculation of the carbon dioxide fixed in a phosphate buffer is a theoretical one devised by Johnson (1941). This method is based on the fact that the dissociation constant for bicarbonate ions in the presence of carbon dioxide bears a constant relation to the temperature and the pH of the medium. Using this formula as obtained in Umbreit (1957) the respiratory quotient obtained from corrected data is 20,2 % higher than that obtained from uncorrected data.

As this latter method agreed approximately with the experimental data obtained in the experiment with the Dixon flasks and was also much more economical in time and material, it was used throughout all the experiments to be described in this test.

After the completion of the gas measurements, the buds were removed from the flasks by washing with distilled water into a filter. They were then surfaced dried, placed in a weighing bottle and weighed. The buds were then dried at 110° C for 6 to 12 hours and weighed. The water content of the buds was calculated as follows :

$$\frac{\textit{Fresh weight} - \textit{dry weight} \times 100}{\textit{Fresh weight.}} = \text{percentage water content}$$

With all the buds whether from long or short days the water content was found to lie between 89 % and 94 %. This variation of 5 % could not be related in any way to any group of buds. The variation was found in buds from the 1st node as well as in buds collected from the 5th node.

At the time of preparation of the buds for the respiration measurement, a sample of 10 was put aside preserved in an alcohol solution. These buds were afterwards removed from their preservative, surfaced dried and placed on photographic paper in order to obtain a print of their actual dimensions.

Before proceeding further it had to be established that this technique gave a true measure of respiration and that there

were no errors due to the limitation of the diffusion of gases by the size of the tissue or the quantity of fluids in the flasks.

When gas diffusion is a limiting factor, the rate of oscillation of the flasks has a considerable effect on the results (Dixon 1952).

Experiment I.

The rate of oscillation of the flasks was changed twice to see if the measures of gas exchange would be affected. This experiment was carried out using 5th node buds that had been cultivated in an ordinary heated greenhouse and given artificial light. From table XIV it is seen that oxygen absorption and carbon dioxide emission fall gradually throughout the experiment. However, they fall by equivalent amount as the respiratory quotient (R. Q.) does not differ throughout the experiment. The change from oscillations at 71 /minute to 91 /minute and back again does not affect the respiration results in any way.

TABLE XIV

COMPARISON OF RESPIRATION RATES OF 2MM SLICES OF 5TH NODE BUDS ON PASSING FROM A SHAKING RATE OF 71 TO 91 AND RETURNING TO 71 OSCILLATIONS PER MINUTE OF THE RESPIROMETER FLASKS

Duration of experiment in minutes	Period of oscillations	Oxygen uptake $Q \cdot O_2$	Carbon dioxide evolved $Q \cdot CO_2$	Respiratory quotient (*)
35		119	75	0.63
45		119	61	0.51
55	71 /min.	93	77.9	0.83
65		106	77.0	0.73
75		106	62	0.59
85		106	77	0.73
95		106	77	0.73
105	91 /min.	106	62	0.59
115		115	75	0.63
125		93	93	1.0
135		93	79.9	0.63
145		106	33	0.31
155	71 /min.	119	103.9	0.86
165		106	48	0.46

(*) Respiratory quotient not corrected for fixation of carbon dioxide in buffer.

The R.Q. results in this experiment are low as no correction has been made for the quantity of carbon dioxide that has been fixed in the phosphate buffer.

Experiment II

In order to verify the above results, the same experiment was repeated but this time buds were cut transversely into 2mm slices. The results are shown in table XV. Cutting a portion of the buds into slices was carried out as a check on the possibility that the bud size might be acting as a hindrance to the free exchange of the respiratory gases.

TABLE XV

COMPARISON OF RESPIRATION RATES OF UNSLICED 5TH NODE BUDS ON PASSING FROM A SHAKING RATE OF 71 TO 91 AND RETURNING TO 71 OSCILLATIONS PER MINUTE OF THE RESPIROMETER FLASKS.

Duration of experiment in minutes	Period of oscillations	Oxygen uptake $Q \cdot O_2$	Carbon dioxide evolved $Q \cdot CO_2$	Respiratory quotient (*)
45		108.0	69.9	0.65
55		94.5	69.1	0.74
65	71 /min.	80.5	42.4	0.53
75		112.0	86.8	0.72
85		94.0	69.1	0.74
95		108	82.6	0.77
105		108	69.6	0.65
115	91 /min.	108	69.6	69.6
125		80.5	67.6	0.84
135		94.5	56.4	0.60
145		80.5	55.1	0.69
155	71 /min.	94.5	69.1	0.73
165		67.5	54.6	0.81

(*) Respiratory quotient not corrected for fixation of carbon dioxide in buffer.

The average results for the R.Q. in sliced and unsliced buds is approximately the same and is not affected by the change in oscillation frequency.

Experiment III

A third check on the possibility of physical errors consists of observing the oxygen consumption, carbon dioxide emission and R.Q. values in relation to the size of the buds. If gas diffusion was limited by tissue size then using buds of different sizes, or sliced and unsliced buds, should give some evidence for or against the existence of this physical limitation.

These various aspects of respiratory activity are shown along with an indication of bud size in table XVI.

As a fourth check, the buds from 8 and 16 hour days are divided into two groups within each treatment. Each of these groups differs from its pair in having a significantly different mean size of bud. This segregation is shown in table XXIV, (see also page 100). In spite of this difference in size, there is no significant difference in any of the respiratory activities.

TABLE XVI

SUMMARY OF AVERAGE RESPIRATION RATES OF SLICED AND UNSLICED 5TH NODE BUDS OF SALVIA FROM LONG DAYS ON PASSING FROM 71 TO 91 AND RETURNING TO 71 OSCILLATIONS PER MINUTE OF THE RESPIROMETER FLASKS.

Period of oscillations	Average oxygen uptake $mm^3/10$ min./100 mgms. d. w.		Average carbon dioxide evolved $mm^3/10$ min./100 mgms. d. w.		Respiratory quotient (*)	
	unsliced	sliced	unsliced	sliced	unsliced	sliced
71/min.	97.9	108	64.7	71	0.67	0.67
91/min.	101.1	105	72.3	76	0.72	0.73
Return to 71/min.	84.2	106	58.8	66	0.70	0.56

(*) Respiratory quotient not corrected for fixation of carbon dioxide in buffer.

In considering the limitation of gas diffusion, no two gases would be limited to the same extent by any one set of conditions, due to differences in their diffusion constants. Thus, by changing the conditions for gas diffusion by shaking the flasks at different speeds, using sliced and unsliced tissue, and comparing buds of

different sizes, all of which have no effect on the respiratory quotient values, it can be concluded that the diffusion of the two gases has not been limiting.

It was stated on page 87 that the period between the 25th and the 85th minute was usually taken as the time in the experiment that represented the respiratory activity of the buds, and that this value, although it fell with time, only fell slightly. This is based on the results of these last three experiments where the measurements were carried out over a 3 1/2 hour period.

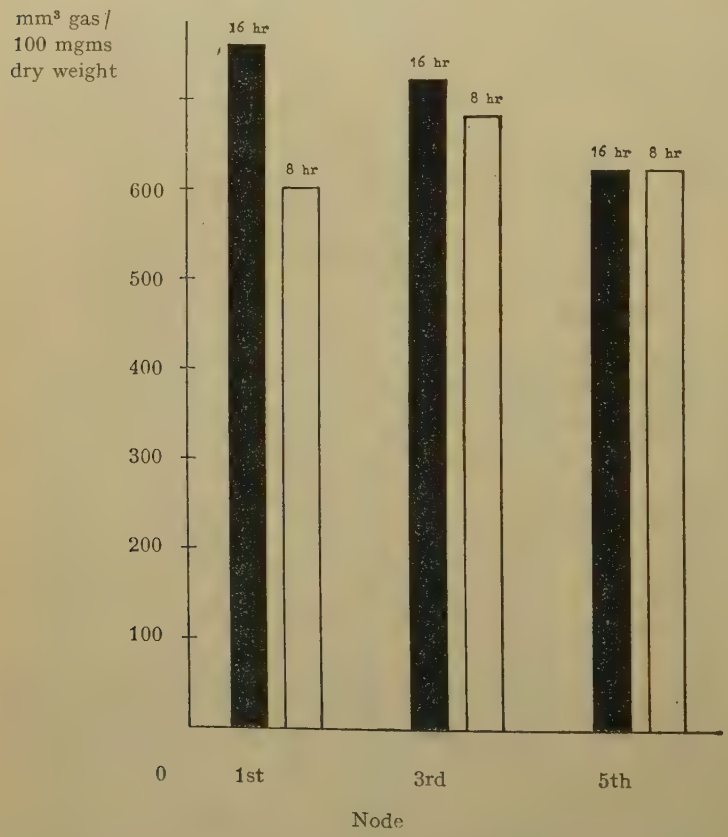


FIG. 35. — Oxygen uptake of 1st, 3rd and 5th node buds in 16 and 8 hour days.

It was therefore concluded that measures always taken in the first hour after equilibration, following similar times for collection and preparation of the buds in the flasks would yield compa-

rable results. By always using the same number of buds and following a standard technique the time necessary to set up the experiment would thus be kept uniform.

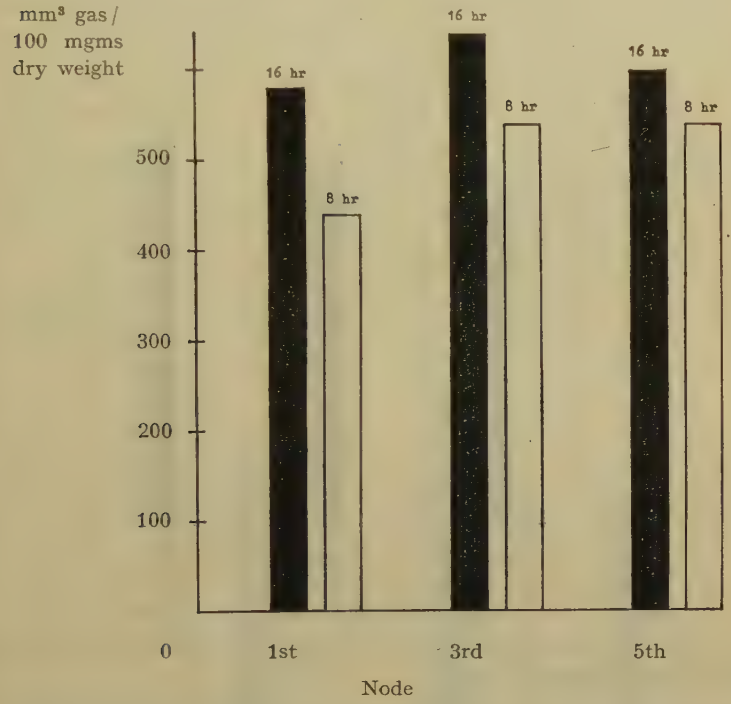


FIG. 36. — Carbon dioxide evolution from 1st, 3rd and 5th node buds grown in 16 and 8 hour days.

In designing these experiments originally, the young apical buds were chosen not only because they were the youngest meristematic and developing tissue of the shoot that could be investigated but also as when contemplating the respiration experiments their lack of stomata is an advantage. If the respiration experiments had been carried out with adult leaves attention would have to have been paid to the effect the periodic opening and shutting of the stomata had on the gas exchange from the leaves. The buds of this size contain three young pairs of leaves. These leaves are completely devoid of stomata. Instead the surfaces of the leaves are completely covered by hairs and stalked glands, (see fig. 27). The gas exchange for respiration must therefore take place through these appendages as well as

through the leaf epidermis. This represents a relatively large surface area for the small amount of tissue that is present in such young leaves and probably explains why no evidence of hindrance of gas diffusion is found.

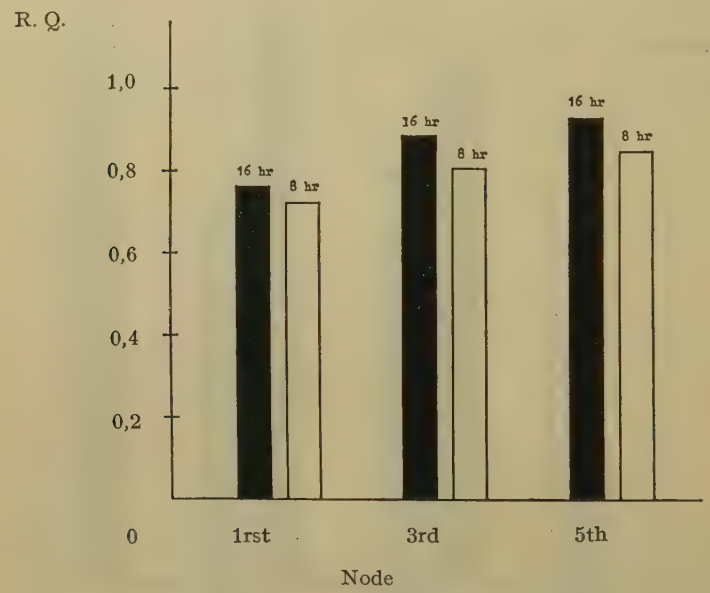


FIG. 37. — Respiratory quotient (R. Q.) of the 1st, 3rd and 5th node buds grown in 16 and 8 hour days.

It is considered that the method of measuring gas exchange as described above gives a method that is reasonably free from errors due to gas diffusion in the tissue or fluids being a limiting factor, or to other errors that could arise from the handling and preparation of the material.

THE RESPIRATORY ACTIVITIES OF THE BUDS IN THE COURSE OF THE DEVELOPMENT OF THE PLANTS IN 8 AND 16 HOUR DAYS.

From the section of this work dealing with the photoperiodic reaction of the plants, it was shown that the flower initiation stimulus started to act on the plant after the appearance of the 1st node and that by the time the third node had been produced the plant had been induced to flower. That in spite of this pro-

found physiological change little was seen in the modification of the morphology of the apical bud was shown in the examination of the section made of these buds. It was decided to follow in this section the classification of the buds adopted in the section on morphology as a result of the photoperiodism experiments. In this way the following six classes of buds are obtained :

(1) Long day 1st node buds at the beginning of flower induction.
(2) » » 3rd » » » » completion » » »
(3) » » 5th » » before the apparition of flower primordia.
(4) Short day 1st » » as a control for 1st node long day buds.
(5) » » 3rd » » » » » 3rd » » » »
(6) » » 5th » » » » » 5th » » » »

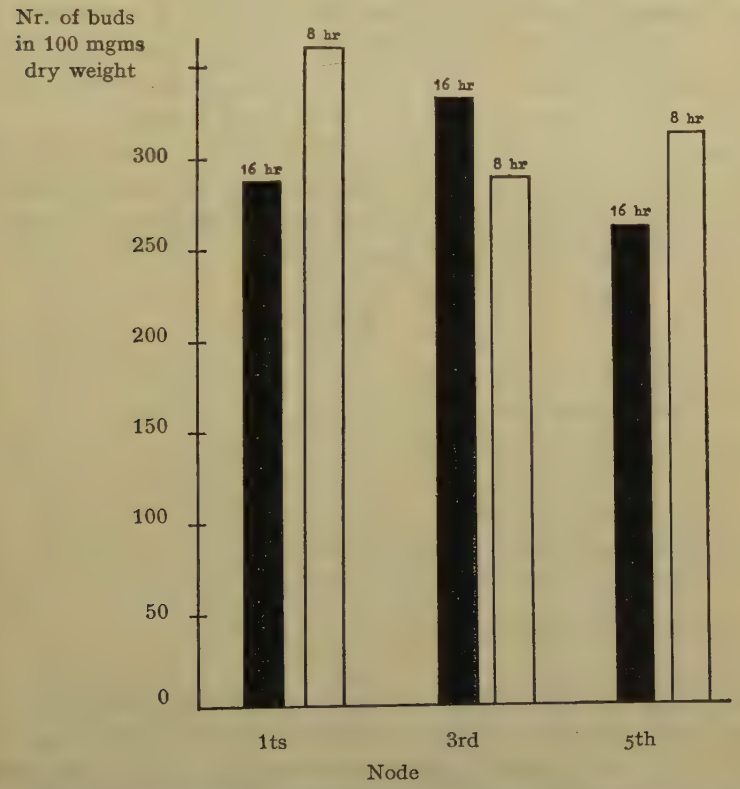


FIG. 38 — Number of buds in 100 mgms dry weigt in 1st, 3rd and 5th node buds grown in 16 and 8 hour days.

Of these 6 classes, the only one that differs morphologically in any way from the other is class three, the 5th node long day

buds. These buds show a pronounced rounding of the apex and a development of the axillary buds. This difference though of great morphological significance produces only minor changes in the types and quantities of the different tissues present when the bud is considered as a whole. It is therefore thought unlikely that these changes by themselves alter the physical characteristics of the buds sufficiently to exclude them from being compared with the other buds.

Respiration measurements as described in the preceding section on methods were carried out for a minimum of ten samples in each of the above classes of buds. The results obtained for oxygen uptake, carbon dioxide evolution and for the respiratory quotient as well as for the weight of the buds are recorded tables XVII, XVIII, XIX, XX. The mean values for these results are illustrated in figs. 49 to 52. (QO_2 is the oxygen uptake by 100 mgms dry weight in mms ^{3} per hour).

These results are analysed statistically by the method of two group comparisons in order to determine if the mean values obtained differed from one another by a significant amount, (see table XXI, XXII). The formula used was —

$$t = (x_1 - x_2) \sqrt{\frac{n(n-1)}{\epsilon x_2}}$$

Where t = student' s t test
P = percentage probability
X_1 = average for sample 1
X_2 = average for sample 2
n = number of observations per group
x_2 = sum of square of mean differences

For details see Snedecor (1956).

The buds are selected at the moment of collection from the plants to have as far as possible the same size in all the samples taken. As a check on any possible variation from one experiment to another, the buds are weighed and the number of buds that would be required to yield 100 mgs dry weight is calculated. This number which in this text will be referred to as (R) is a valid measure of the state of expansion of all the buds as has been previously stated the percentage moisture in the buds remains

TABLE XVII

COMPARISON OF RESPIRATORY ACTIVITIES OF *first node buds* OF SALVIA IN 16 AND 8 HOUR DAYS.

Observation	16 hour days			8 hour days		
	Oxygen uptake $Q \cdot O_2$	Carbon dioxide evolved $Q \cdot CO_2$	R. Q.	Oxygen uptake $Q \cdot O_2$	Carbon dioxide evolved $Q \cdot CO_2$	R. Q.
1	1019	715	0.70	849	683	0.80
2	772	458	0.59	670	514	0.62
3	970	776	0.80	633	444	0.70
4	658	423	0.64	498	300	0.60
5	700	526	0.75	491	320	0.65
6	886	769	0.87	489	346	0.71
7	607	645	1.06	583	428	0.73
8	619	367	0.59	611	411	0.67
9	693	663	0.96	718	685	0.95
10	696	666	0.96	487	349	0.72
Sample mean	762	601	0.79	603	448	0.72

TABLE XVIII

COMPARISON OF RESPIRATORY ACTIVITIES OF *third node buds* OF SALVIA IN 16 AND 8 HOUR DAYS.

Observation	16 hour days			8 hour days		
	Oxygen uptake $Q \cdot O_2$	Carbon dioxide evolved $Q \cdot O_2$	R. Q.	Oxygen uptake $Q \cdot O_2$	Carbon dioxide evolved $Q \cdot O_2$	R. Q.
1	994	789	0.79	701	460	0.66
2	784	726	0.92	704	508	0.72
3	772	709	0.92	846	656	0.78
4	1006	860	0.85	599	439	0.73
5	589	468	0.79	784	521	0.66
6	543	515	0.95	532	429	0.81
7	635	629	0.99	629	554	0.88
8	624	622	1.00	882	864	0.98
9	668	653	0.98	679	692	1.02
10	652	642	0.98	518	478	0.92
Sample mean	727	661	0.92	687	560	0.82

TABLE XIX

COMPARISON OF RESPIRATORY ACTIVITIES OF *fifth node buds* OF SALVIA IN 16 AND 8 HOUR DAYS.

Observations	16 hour days			8 hour days		
	Oxygen uptake $Q \cdot O_2$	Carbon dioxide evolved $Q \cdot CO_2$	R. Q.	Oxygen uptake $Q \cdot O_2$	Carbon dioxide evolved $Q \cdot CO_2$	R. Q.
1	544	503	0.92	685	473	0.69
2	608	497	0.82	553	374	0.68
3	668	656	0.98	647	461	0.71
4	575	478	0.83	583	414	0.71
5	748	713	0.95	569	534	0.94
6	562	612	1.08	538	513	0.95
7	709	670	0.94	510	523	1.03
8	677	668	0.99	648	749	1.16
9	737	756	1.03	703	604	0.86
10	566	596	1.05	909	957	1.05
Sample mean	639	615	0.96	635	560	0.88

TABLE XX

COMPARISON IN VARIATION IN SIZE OF BUDS WITHIN AND BETWEEN THE PAIRED GROUPS FROM 8 AND 16 HOUR DAY PLANTS AS EXAMINED IN THE RESPIRATION EXPERIMENTS.

UNIT OF BUD SIZE = R = NUMBER OF BUDS REQUIRED TO GIVE 100 MGMS. DRY WEIGHT.

No. of Observation	16 hour day			8 hour days		
	1st node R	3rd node R	5th node R	1st node R	3rd node R	5th node R
1	303	272	275	337	350	259
2	324	278	366	410	309	264
3	308	330	248	382	292	240
4	402	354	256	440	294	285
5	402	330	238	286	365	312
6	267	250	208	340	356	305
7	244	354	222	423	322	410
8	273	494	264	346	294	379
9	238	438	276	400	272	333
10	223	324	285	349	90	366
Sample mean	298	342	267	371	294	315

very constant whatever their treatment. The number R would therefore also be an indication of the fresh weight of the different batches of buds relative to one another.

TABLE XXI

SUMMARY OF STATISTICAL TESTS FOR SIGNIFICANT DIFFERENCES IN THE RESPIRATORY ACTIVITIES OF PAIRED GROUPS OF SALVIA BUDS FROM DIFFERENT NODES BUT GROWN IN THE SAME LENGTH OF DAY.

Respiration measurement	16 hour days		8 hour days	
	Between nodes	Value of P at which difference significant	Between nodes	Value of P at which difference significant
Oxygen	1-3	not significant	1-3	not significant
	3-5	5 %	3-5	»
	1-5	5 %	1-5	»
Carbon dioxide evolved	1-3	not significant	1-3	»
	3-5	»	3-5	»
	1-5	»	1-5	»
R. Q.	1-3	»	1-3	»
	3-5	»	3-5	»
	1-5	5 %	1-5	5 %

Table XX presents the average values of (R) throughout the respiration experiments. It will be noted that in spite of the selection a considerable amount of variation has taken place. A summary of this variation in size as compared by the above statistical test is given in table XXIII, for those pairs of classes of buds that have been found to have a respiratory activity differing by a significant amount.

Before the comparisons of respiratory activity can be considered to have any meaning, it has to be shown that the differences in respiratory activity recorded are due only to the lighting treatment given and are not due to differences in bud size.

Table XXIV represents an analysis of the respiratory activity and but size within the 16 and 8 hour treatments with 1st node buds. The observations are divided into two groups.

TABLE XXII

SUMMARY OF STATISTICAL TESTS FOR SIGNIFICANT DIFFERENCES IN THE RESPIRATORY ACTIVITIES OF PAIRED GROUPS OF SALVIA BUDS FROM LONG AND SHORT DAYS.

Respiration measurement	Node	Comparison between	Percentage probability (P) at which difference is significant
Oxygen uptake	1st	8 and 16 hour days	2.5
	3rd	»	not significant
	5th	»	»
Carbon dioxide evolved	1st	»	2.5
	3rd	»	not significant
	5th	»	»
R. Q.	1st	»	»
	3rd	»	1.0
	5th	»	not significant

TABLE XXIII

SUMMARY OF STATISTICAL TESTS FOR SIGNIFICANT DIFFERENCES IN THE SAMPLE MEANS OF BUD SIZE BETWEEN THOSE PAIRED GROUPS THAT SHOWED A SIGNIFICANT DIFFERENCE IN THEIR RESPIRATION ACTIVITIES.

Plants measured	Comparison between	Value of P at which difference significant
at 1st node	16 and 8 hour days	1 %
» 3rd »	» »	not significant
from 16 hour days	3rd and 5th nodes	2.5 %
» » »	1st » 5th »	not significant
» 8 »	1st » 5th »	2.5 %

In one group are placed those buds whose size (R) falls below the average for the group as a whole, while in the other group are placed the buds whose average size is greater than the value obtained for the whole group. This gives for the ist node buds from 16 and 8 hour days two sub-groups whose average size differ by a significant amount. In the buds from 8 hour days

TABLE XXIV

COMPARISON OF VARIATION IN OXYGEN UPTAKE OF 1ST NODE BUDS AS AFFECTED BY THE SIZE OF THE BUDS, EACH GROUP OF OBSERVATIONS BEING DIVIDED INTO THOSE BUDS WHOSE SIZE (R) IS GREATER THAN THE MEAN AND THOSE BUDS WHOSE SIZE IS SMALLER THAN THE MEAN. THE OXYGEN UPTAKE OF THESE TWO SUB-GROUPS IS THEN COMPARED.

Observations	16 hour days				8 hour days			
	mean sample size R = 298				mean sample size R = 371			
	R 298		R 298		R 371		R 371	
	R.	$Q.O_2$	R.	$Q.O_2$	R.	$Q.O_2$	R.	$Q.O_2$
1	303	1073	267	932	410	718	337	897
2	324	817	244	674	440	523	286	518
3	308	1022	273	670	423	622	346	650
4	402	695	238	814	400	765	349	515
5	402	736	223	741	382	668	340	518
Sample mean	348	868	249	766	411	659	331	619

R. = number of buds required to give 100 mgm. dry weight.
$Q.O_2$ = mm^3 oxygen absorbed/hour/100 mgm. dry weight.

the average size of the buds for the whole group was R 371.The average R values for the two sub-groups were 411 and 331.These last two values differed by an amount that was significant at P 1 %. The two corresponding values for the uptake of oxygen by the buds belonging to these two different subgroups of different size were 659 and 619 QO_2. These two values for oxygen consumption have no significant value at a level of P 5 %. This same test has been carried out for 16 and 8 hour buds from the 1st node not only for oxygen uptake, but also for carbon dioxide evolved and for the respiratory quotient values. In no case was bud size found to bear any relation to the respiratory activities.

Thus it is seen that the respiratory differences indicated by the average values for oxygen uptake and carbon dioxide evolution in 1st node buds represents a real difference between long day buds and short day buds, and further it indicates that this difference is due to the effect of day length.

A further difference between long and short day buds that is also seen in table XXII is that the respiratory quotient of third node buds is significantly higher in long day buds than in short day buds. On regarding the quantities of oxygen and carbon dioxide exchanged from these third node buds, no significant difference is seen between long and short day treatments at a probability level of P = 5 %, due to the large experimental variation. A difference however is seen at a probability level of P 10 %. The respiratory quotient being a less variable quantity showed a significant difference at P 1 %. To show that this derived result came from levels of gas exchange that were different from one another would only require some further observations to compensate for the large experimental variation.

Comparison of internodal respiratory activities.

In comparing the respiratory activities of the buds from node to node in each of the day lengths used, some differences are found in two cases.

1° A significant difference is found to lie between the oxygen uptake of 1st and 5th node buds grown in long days. On closer examination this difference is seen to lie between the 3rd and 5th node buds. In this case the oxygen consumption has fallen with the ageing of the plants. The 5th node buds take up less oxygen than the 1st or the 3rd node buds. The values obtained for the amount of carbon dioxide respired remain constant for each node, and this, together with the fall in oxygen consumption, accounts for the rise in the respiratory quotient which can be seen in fig. 37. The rise in the respiratory quotient between the 1st and the 5th nodes shows a statistical difference at a level of probability of P 5 %. It is approaching unity.

2° In short day conditions the buds show also an increase in the respiratory quotient and the amount of carbon dioxide respired with the ageing of the plants. In this case however, only the respiratory quotient shows a significant difference at P = 5 %, between the 1st and 5th node buds. Due to experimental variation no difference can be seen between the amounts of oxygen and carbon dioxide exchanged. The rise in the respiratory quotient is lower than in 1°, but it is supposed that it may reach the same value later.

The effect of the interruption of the night of the respiration of the excised buds.

The following experiments were carried out at the same time as the photoperiodism experiments on the effect of the interruption of the night on the flowering of the plants. It was proposed to measure the respiration of first node buds growing in 9 hour days and in 7 hour days with a two hour period of illumination in the middle of the night. The experiment was designed to find out if there was a parrallel between the effect of the night illumination on flowering and its effect on the respiration of the buds. The first node buds were chosen as they were found from the previous experiments on the effect of day length on flowering, to respond most to the different treatments given.

Method

The experiments on buds illuminated for 7 hours and 7 plus two hours in the night were carried out exactly as with the experiments using 8 and 16 hours illumination. When giving the two hour light break 7 1/2 hours of darkness were allowed before and after the light break. These experiments on light break were carried out using the same batch of seed, sown at the same time in identical conditions of temperature and humidity as used in all the 8 and 16 hour experiments. The intensity of light used was the same in all cases. The light given during the night break had the same intensity as that which was given during the period of day illumination.

Results

For each treatment a minimum of 15 separate measurements were carried out. These results are recorded in table XXV along with the results for respiration in 8 and 16 hour days which are included for purposes of comparison with the average values obtained from the 9 and 7 plus 2 hour illuminations. Neither of these figures differs from the average value obtained for the consumption of oxygen in 8 hour days. The illumination in the middle of the night had no effect on the oxygen uptake of the plant. This negative result was paralleled bya similar negative finding on the effect of the interruption of the night on flowering. In

neither flowering nor respiration was any difference distinguishable between the illumination of the plants for a period of 9 hours and the breaking of the light into two periods, one of 7 and the other of 2 hours.

TABLE XXV

COMPARISON OF OXYGEN UPTAKE OF IST NODE BUDS IN 9 HOUR DAYS WITH THAT OF BUDS IN 7 HOUR DAYS RECEIVING 2 HOURS SUPPLEMENTARY ILLUMINATION IN THE MIDDLE OF THE NIGHT, FOR FURTHER REFERENCE THE OXYGEN UPTAKE OF IST NODE BUDS IN 8 AND 16 HOUR DAYS IS ALSO INCLUDED.

Observations	9 hours $Q.O_2$	7 + 2 hours $Q.O^2$	8 hours $Q.O_2$	16 hours $Q.O_2$
1	632	703	849	1019
2	652	666	670	772
3	512	657	666	970
4	794	509	498	700
5	588	622	491	886
6	505	559	484	607
7	465	653	583	619
8	685	519	611	693
9	434	502	718	658
10	826	473	487	696
11	538	439	–	–
12	600	703	–	–
13	795	633	–	–
14	454	566	–	–
15	547	–	–	–
Sample mean	602	586	603	762

DISCUSSION OF PART III.

When the plants are kept in 16 hour days where they are able to complete their life cycles, it is seen that the uptake of oxygen by the buds decreased from the 1st to the 3rd and from the 3rd to the 5th node. This downward track in the respiratory activity of the apical meristematic region of the plant was also noted by Kidd et al (1921). Similar changes in the respiration of *Mercurialis perennis* which were related to changes taking place in the male and female plants at different moments of their life cycle, were reported by Bouillenne (1935). On comparing

the 8 hour day buds with those grown in 16 hour days, the greatest difference is seen with the first node buds. The most probable explanation of this would be that the buds in 8 hour days are grown under conditions that are limiting in providing enough substrate for the respiratory processes of the plant (oxygen uptake less in 8 hour than 16 hour days. The difference between the 8 and 16 hour buds in oxygen uptake disappears however as the plants age. By the time the 5th node is reached the oxygen uptake in long and short days is identical. This is mainly due to the fall in oxygen uptake by the long day buds.

In comparing these results with those of other authors, a general agreement is found. Elliot and Leopold (1952) found that in measuring the oxygen uptake of long day plants that the uptake in oxygen decreased on flower induction. They also found the reverse effect, an increase in oxygen uptake on flower induction in short day plants. Bode (1942) found that on measuring the oxygen uptake in Kalanchœ (a short day plant) that respiration was greater in those plants that were kept vegetative. These experiments could be said to show results similar to the data given above for Salvia. Although in the latter case the vegetative plants do not at any time show a greater uptake of oxygen than the reproductive plants, yet it is the plants that are induced to flower that show a decrease which if it had been followed to the stage at which the plants were actually in flower, might well have been less than the oxygen uptake of the vegetative plants.

The carbon dioxide given off by the respiring buds increases with the age of the plant in short day treatments. The long day buds, however, show little change in this respect. As with the oxygen uptake, the greatest difference is seen in the case of the 1st node buds where the carbon dioxide given off by the long day buds is significantly greater than in the short day treatments. This difference diminishes with the 3rd node buds, and by the time the 5th node is reached, the long day buds give off almost the same amount of carbon dioxide as the short day buds. The effect of this change in the amount of carbon dioxide rising or remaining constant while the uptake of oxygen by the tissues fell is seen in the respiratory quotient which rises between the 1st and 5th node buds by a significant amount. The role of carbon dioxide has been discussed by many authors with regard to the induction of flowering. It is known that with several short

day plants (Langston and Leopold 1954, Spear and Thimann 1954, see historical review 23, that the fixation of carbon dioxide in the dark is an essential if flower induction is to be successful. Whether the changes in respiratory quotient values bear any relation to the change in the plant's ability to fix carbon dioxide in the dark which is related to the ageing and flowering of the plant is purely conjectural at this stage. It is possible that the young tissues have a greater need for the dark fixation of carbon dioxide in order to synthesize organic acids such as oxaloacetic and citric acid which are essential to the proper functioning of the respiration of the tissue. As the respiratory quotient is a resultant from a large variety of catabolic as well as anabolic processes, it is impossible to deduce anything with certainty from such minor fluctuations in its value.

The value of 0,8 for the respiratory quotient which is found for most of the vegetative buds examined agrees with the figure given by James (1953) for the respiratory quotient of leaves forced in a greenhouse.

Early workers on the respiration of the meristematic regions of the plant held that all meristems whether from the root or the shoot exhibited anaerobic respiration. This idea was originally put forward by Ruhland and Ullrich in 1929. The data are reviewed by Ruhland and Ramshorn (1938). These findings led Warburg (1947) to advance the theory that all meristematic tissue is only capable of anaerobic respiration. This included both vegetable and plant material and neoformations. In a paper on cancer, Warburg (1956) suggests that if a method could be found to impair this anaerobic respiration, then a method would have been found to control the growth of cancer cells.

It was shown by Wanner (1944 and 1945) that the respiration of root tips followed a zonal graduation and that oxygen was the limiting factor that hindered respiration in the extreme distal portion of the tip. This was confirmed by Berry (1949) and by Betz (1957). The latter was able to demonstrate the effect of a pasteur effect in the root tips. This led Kandler (1958) to the discovery that the anaerobic respiration that had been observed in the root tips by the earlier authors was not obligatory, but only due to the relatively slow rate of the diffusion of oxygen in the densely packed cells of the root tip. This was confirmed by Betz (1958) in experiments in which he calculated the quantity of alcohol synthesized by the roots.

Due to these detailed researches on the respiration of root meristems, the old idea that all meristematic tissues had obligatory anaerobic respiration has now been abandoned. A pasteur effect has been described in dormant winter buds (Löhr 1957). With regard to active stem meristems, no data are available which claim anaerobic respiration for this tissue apart from those of Ullrich and Ruhland and their co-workers. It is therefore not surprising that in the above experiments with Salvia that no respiratory quotient values are obtained that are greater than unity. The buds contain much more than just that which is meristematic tissue and further the young leaves being in the open position that as seen in fig. 29 as well as very thin in section there is little to impede the diffusion of oxygen to the innermost cells as in the case with the cells of the root tips.

Findings and Conclusions of Part III.

This part of the work was designed to find out if any relation existed between the respiratory activities of the young apical buds and what is known about the nature and timing of the plant' s reactions to the photoperiodic stimulus.
The findings are as follows :

1° In 1st node buds oxygen consumption and carbon dioxide evolution are higher in 16 than in 8 hour days. The respiratory quotient does not change by a significant amount with this activation.

2° The increase in gas exchange noted in 1° is independant of the variations that existed in bud size.

3° Oxygen uptake fell from the 1st to the 5th node in long day buds by a significant amount. At the same time, little change was noted in oxygen uptake from node to node by the short day buds, so the difference between the long and short day buds noted in 1° disappeared by the time the 5th node bud was formed.

4° The respiratory quotient of both long and short day buds rose by a signifiandt amount between the measurements made on the 1st and 5th node buds.

5° The interruption of the night by a period of two hours light after a day length of 7 hours had no effect on the respiration of the buds as compared with the results obtained from buds that had received 9 hours illumination with no interruption of the night.

The greatest difference between the respiration of the buds from the short and long day plants is seen in those measurements made on 1st node buds. This difference gradually disappears with age. By the time the buds have reached the third node stage, no significant difference is found in the actual amounts of oxygen or carbon dioxide respired, only the respiratory quotient is greater in the long day buds than with buds from short days. In both day lengths the R.Q. approaches unity with ageing.

The respiratory quotient rising and approaching unity in long day buds during flower induction (1st and 3rd nodes) seems to correspond to the hypothesis of R. Bouillenne (1935, 1946) where it is suggested that the RQ = 1, observed by him in experiments on the role of water content variations in the plant tissue could be connected with flower induction. The RQ approaching unity later in short day buds may be explained in the case of *Salvia splendens* because it is not a true long day speciès as it is flowering in 8 hour day.

The falling off in respiratory activity that is noted between the 1st and 5th nodes being a common feature in both long and short days, appears therefore to be connected with the ageing of the plants rather than with the induction of flowering by day length.

The experiments on the effect of the interruption of the night on the respiration of the 1st node buds gave results that are parallel to those obtained with the effect on the interruption of the night on the flowering of the plant as was described in Part I, The explanation advanced is also suggested here for the finding of a negative result. From the other data obtained on the effect of different day lengths on flowering, it is probable that the initial short day given of 7 hours to which the supplementary lighting was added, gave a total illumination period that was too long for any stimulation to be noted in either flowering or respiration.

As the greatest difference in respiratory activity as affected by day length was found with the 1st node buds, it was decided to follow this up in an other serie of experiments which would try and show the reason for this difference. Whether the superior activity of the 16 hour buds over those coming from the 8 hour days is due to a lack of substrate for he respiratory needs of the plant in short days, or whether it is due to the plants in long days being able to use other enzyme systems that are not brought into use in the 8 hour days, cannot yet be determined.

GENERAL DISCUSSION.

The main purpose of this discussion is to consider all the experiments with regard to each other and the bearing that they have on the current theories on flower induction by photoperiodism.

In the first part, it was seen that *Salvia splendens* Sello var. Feu de la Saint Jean, cultivated in the Phytotron de Liège, is a normal long day plant flowering rapidly in 16 hour days but remaining vegetative indefinitely when the day length is kept to a maximum of 7 hours. This photoperiodic reaction appears to be fixed as no modifications could be brought about in the plant's preference for long days by altering the temperature of the environment either in a constant or fluctuating manner.

An examination of the effect of varying day lengths on the flowering response of the plant showed that on increasing the length of day given, the time necessary for the production of flowers was greatly reduced, from 110 days with plants kept in 8 hour days to 40 days in 16 hour days. Further increases in day length produced no further acceleration in the development of the even when continued as far as 24 hours light, (continuous illumination). These results agree with the modern interpretation of photoperiodism on a quantitative basis as described by Lang (see page 11 of the historical review). Lang cited the example of *Xanthium strumarium* where increasing day length accelerated flower production up to a certain limit. The critical change in day length took place on increasing the day from 7 to 9 hours. This is of importance in the experiments dealing with the theory of Bünning and was dealt with in an earlier discussion.

As soon as the germinating seedlings were placed in the two different day lengths, they began to differ from one another in several ways. The long day plants immediately assumed a darker colour of green in the leaves as they appeared and even in the cotyledons where the change in pigment content was well marked. This agrees with the findings of Bode (1947) and Taranez

(1950). The growth rate of long day plants was also greater than that of those kept in short days.

On transferring the long day plants to short days at successive intervals, it was found that the plants had only to remain 17 days in the long day growth room for flower induction to have taken place. Thus the action of the long days in promoting flowering had taken place in the plant between the appearance of the 1st and 3rd nodes. Plants which had been transferred to short days before they had received the full flower inducing treatment were unable to produce normal flowers. A portion of the plants tranferred in this way would form flower buds but these would abort before the flowering stalk had developed. Thus for flowering to be successful in Salvia a greater number of flower inducing cycles had to be given than was necessary for the initiation of the formation of flower primordia. When this extra induction was not given, flower bud abortion took place very rapidly. Struckmeyer (1941) using a short day flowering variety of Salvia splendens describes findings that are the same as with the long day variety used in the work for this thesis. In both cases it is seen that although flower primordia may be initiated relatively rapidly, the plant is unable to sustain flower production unless the photoinduction period is prolonged. This necessity for continued photoinduction for the continued production of plant flowers continues throughout the life of the plant. Plants in full bloom will revert to the vegetative condition if they are transferred to 7 hour days. According to Chouard (1949) plants vary in their capacity to revert to the vegetative state. It is mostly among the short day plants that examples are known where once flower induction has been completed the plant remains induced for ever.

Sironval (1951) working with a long day flowering variety of strawberry records that once flowering has been induced in mature plants then they retain the reproductive condition permanently.

To obtain a preliminary idea of the metabolic changes that might accompany the induction of flowering, the respiration of the apical buds of long and short day plants was measured when the plants had attained their 1st, 3rd and 5th nodes. In this way a measure was obtained of respiration when the young plant was first responding to the treatment in day length, at the

time when flower induction had been accomplished and finally just before the appearance of the flower buds. The parallel measurement from the buds of short day plants served as a control against which the effect of the ageing of the plant, as apart from flower induction, could be gauged.

The greatest difference between the long and short day plants was found in the case of the first node buds where the respiration showed a clear activation in the long day plants. But at this stage flower induction had not been completed although there was evidence that some change in this direction had already taken place. Would a study of the plants at this stage in their development yield a true picture of the metabolic changes that accompany flowering ?

It is equally important to distinguish the immediate effect that the photoperiod produces in the plant from the consequences of photoinduction that are seen later in the development of the plant. It was partly for this reason that is was decided to follow the course of the respiratory activities of the plants in both long and short days with the development and ageing of the plants. Kidd (1921) and Bouillenne (1935) had already shown that in the life cycle of plants changes in respiration rate are altered by the ageing of the plant in different conditions. Numerous au thors in comparing the rate of some physiological change do so at one moment of the plant' s life cycle chosen empirically without first ascertaining the changes in these activities throughout the various phases of growth and development. Von Witsch (1959) in discussing the aneurin and chlorophyll content in leaves of flowering and non-flowering Kalanchoe does so at only one stage in the development of the plant while it is well known that the pigment content of the leaves is extremely labile and subject to many changes throughout the life of the plant (Strott 1938).

Norris and Calvin (1955) in their researches into the path of carbon in photosynthesis in flowering and non-flowering plants of Kalanchoe used in one set of experiments plants that had already reached the fruiting stage. At this time in the life cycle the leaves are fast approaching senescence when it would be expected that their metabolism would differ from that of the leaves in vegetative plants which are still far from reaching such old age.

These results are a typical example of what was meant when it was stated above that it was important not to confuse the consequences of photoinduction with the immediate effect of photoinduction. If Norris and Calvin had carried out their experiments during the first days when the Kalanchoe plants were receiving the flower inducing periods then they would have been able to reply to the question of metabolic change in relation to photoperiodism in the sense in which it is being considered in this work.

Lang (1952) and Galston (1954) have suggested that the level of auxin concentration in the plant could control flowering. In experiments on the fluctuations in auxin level in Hyoscyamus, Gilson (1957) at Liège, was able to show that the auxin concentration in the leaves of induced and non-induced plants was the same until the induced plants started to produce and to elongate the flowering stalk. From her photoperiodism experiments she was able to show that flower induction had been accomplished before this stage was reached. She concluded therefore that changes in the level of auxin concentration was a consequence and not a cause of the onset of flowering.

It is for this reason that it was felt preferable to study the first reactions that appeared in the Salvia plants in response to the different day length treatments. It was necessary however to consider the possibility of a different primary reaction to photoinduction in cases where the final response of the plant differed due to altered circumstances of age and environment at the time of induction. Although the reaction of the plant to the photoperiod is different, is the basic mechanism for the response the same throughout the ontogeny of the plant ?

Various authors have investigated the stages of plantdevelopment with regard the effect of external stimuli on flowering (see historical review — Lyssenko, Melchers, Jennings, and also Zieracks). It is generally agreed that there exist definite phases during which the plant is sensitive to one stimulus and not to another. Only a few papers have appeared regarding the effect of the photophase on very young plants, as most authors consider the sensitivity of the plants to day length to increase with age. (Borthwick and Parker 1938, Khudairi and Hamner, 1954).

Jennings and Zuck (1954) have claimed that the cotyledon is insensitive to day length as far as the induction of flowering

is concerned. These authors carried out their experiments with young plants that possessed only their cotyledons and the first pairs of true leaves. Zieracks (1952) found that plants could be induced to flower with the cotyledons being the only means of perception of the flowering stimulus, if the plants were allowed to age and the other leaves were removed as they appeared. This has been confirmed in tomato by Bouillenne (personal communication). These experiments of Bouillenne and Zieracks differ in that in the former (Jennings) only plants were used whereas in the latter the ageing of the plants could endow the cotyledons with a potential for flower induction that they may never possess while in the juvenile state. The removal of all the true leaves would also contribute to the change in function of the cotyledons. In the case of the tomato experiments of Bouillenne, it was noticed that the cotyledons persisted on the plant long after the time when they would normally have withered, in those treatments where the adult leaves were not allowed to develop. It has been pointed out (Harder and Springorum 1947) that plants are seldom insensitive to the effect of day length. Although flowering may not be induced during a certain phase in the growth of the plant, day length can have a strong modifying effect on the vegetative characteristics. Bouillenne (1955) in discussing this problem emphasises that for a stimulus to produce any particular reaction in an organism, the receptive organ must be present and in a state in which it is sensitive to the stimulus.

It could be considered that the changes which are produced in the very young Salvia plants by differences in day length are due to the same fundamental reaction as that which later causes the plants to produce flowers. This approach has been adopted by Borthwick et al. (1948, 51,-52,-54). These authors have shown that the action spectrum for flower induction is the same as that which governs germination in light sensitive seeds, and stem and hypocotyl elongation in numerous plants. Numerous other authors (Mohr 1956, Hillman 1957) have also used this method in their studies on the nature of the receptive pigment and on the first reactions in photoperiodism. Mohr (1959) working with the cotyledons of *Sinapsis alba* has shown that their growth can be governed by exactly the same phenomena that were shown to control flowering by Borthwick and his co-workers.

It was therefore considered justifiable to continue the resear-

ches on the photoperiodism of Salvia by investigating the early changes produced by day length in the metabolism of the young buds, even though flower induction had not been completed at this stage.

SUMMARY

The purpose of this work was to investigate in the developing bud of *Salvia splendens* (Sello) var. Feu de la Saint Jean the metabolic changes which were initially produced by the photoperiodic stimulus. The problem was to determine the changes which led to the alteration in the growth-pattern of the developing meristem, these alterations being the first morphological signs of the onset of flowering.

To ensure that the researches dealt with the immediate alterations in the plant' s metabolism and not with the secondary consequences of this change, it was decided to use young buds and to investigate their first biochemical reactions to photoinduction.

1 —*Salvia splendens* was found to be a long day plant. The photoperiodic effect was quantitative. When the day length was 7 hours the plants would remain vegetative indefinitely. On increasing the length of day, flowering was rapidly accelerated, the greatest change taking place on increasing the light given from 7 to 9 hours. The optimal day length was found to be 16 hours. Further increase (up to continuous light) produced no further acceleration in flowering.

2 — The photoperiodic preference of the plant for long days was not altered by any the tried variations in the temperature of the environment. Raising the day and night temperature and in particular allowing them to vary (day 20° C, night 27° C. and vice-versa) increased the vegetative growth of the plant and retarded flowering.

3 — Flower induction is reversible. On placing plants in full bloom in 7 hour days, the plants will revert to their vegetative condition, abortion of all the flowering buds having first taken place.

4 — Flower induction takes place rapidly, starting from the time of germination and is completed on the appearance of the

3rd node. It is not until later, on the appearance of the 5th node that there is a morphological change in the meristem indicating that the plant has changed from leaf to flower production. The first signs of this change visible at the 5th node are a rounding of the apex and an activation of the axillary meristems, shortly followed by formation of flower primordia.

5 — As the young plants first react to the flower inducing stimulus, the oxygen and carbon dioxide exchange of the apical bud rises. As the plants age, oxygen uptake falls but carbon dioxide production remains constant. The fall in oxygen uptake is greater in the long day buds and by the time the plants have reached the 5th node stage, the oxygen consumption of the induced and non-induced buds is the same. The respiratory quotient rises approaching unity for long day buds during the period of induction. The same phenomena occurs with the ageing of the plant in the short day buds.

RESUME

Le but de ce mémoire a été d'étudier, dans les bourgeons de *Salvia splendens* (Sello) var. Feu de la Saint Jean, au cours de son développement les changements métaboliques qui se produisent au début de l'action du stimulus photopériodique.

Il s'agissait de déterminer les changements qui conduisent à une modification de la croissance type du méristème et de la différence des tissues, ces changements étant les premiers signes morphologiques du début de la floraison.

Il fut décidé d'utiliser les jeunes bourgeons et d'examiner les premières réactions biochimiques à la photoinduction de manière à étudier les modifications immédiates du métabolisme de la plante et non des phénomènes secondaires consécutifs à ce changement.

1. *Salvia splendens,* s'est manifesté comme une plante de jours longs dans les conditions fixées dans le Phytotron de Liège. L'effet photopériodique est quantitatif. Lorsque la longueur du jour est de 7 heures, la plante demeure végétative indéfiniment ; si on augmente la durée des heures de lumière quotidienne, la floraison s'accélère rapidement, le plus grand changement ayant lieu en augmentant les heures de lumière données de

7 à 9. La durée des jours optima est de 16 heures. Une augmentation de ces heures d'illumination allant jusqu'à la lumière continuelle ne produit aucune accélération supplémentaire dans la floraison.

2. Les variations de la température ambiante n'influencent pas la préférence photopériodique de la plante pour les jours longs. Si on augmente la température diurne et nocturne et en particulier, si on permet à ces températures de varier (20° C. le jour et 27° C. la nuit et vice-versa), on observe une augmentation de la croissance végétative et un retard dans la floraison.

3. L'induction de la floraison est un phénomène réversible. Si on place les plantes en pleine floraison dans des conditions d'illumination de 7 heures, ces plantes reviennent à la condition végétative après avortement de tous les bourgeons floraux.

4. L'induction de la floraison se produit rapidement, commençant dès le moment de la germination et s'achevant dès l'apparition du troisième nœud. Ce n'est que plus tard, à l'apparition du cinquième nœud, qu'un changement morphologique dans le méristème indique que la production des feuilles fait place à la production des fleurs. Les premiers signes de ce changement, visible au cinquième nœud, sont un arrondissement de l'apex et une activation des méristèmes axillaires, suivis rapidement par la formation des primordia floraux.

5. Dès que la jeune plante réagit au stimulus d'induction de la floraison, les échanges gazeux (oxygène et anhydride carbonique) de l'apex augmentent. Au fur et à mesure que la plante vieillit, la consommation d'oxygène diminue mais la production de l'anhydride carbonique demeure constante.

La diminution de la consommation d'oxygène est plus grande dans les plantes de jours longs et, au moment où la plante atteint le cinquième nœud, la consommation d'oxygène du bourgeon soumis à l'effet inducteur devient la même que celle d'un bourgeon non soumis à cet effet.

Le quotient respiratoire augmente avec l'âge de la plante et ceci est valable pour les bourgeons de jours longs pendant la période d'induction florale (1er au 3^{e} nœuds) et pour les bourgeons de jours courts plus tardivement.

ACKNOWLEDGMENTS

I am greatly indebted to Professor R. Bouillenne, who has directed the work, not only for his advice, help and encouragement throughout the investigation, but also for the hospitality he has extended to me in his laboratories and for the facilities I have enjoyed in the Phytotron.

My thanks are also due to Madame Bouillenne for helpful criticism at all stages of the work. I am also grateful to Dr. Sironval for his constant advice and interest in planning and examining many of the details of the experiments and to M. R. Sauveur for assistance with the photographic illustrations and to Monsieur A. Parmentier and Monsieur G. Sylvestre for the cultivation of plants and assistance in carrying out the experiments in the Phytotron.

I am also grateful to the Carnegie Trust for the Universities of Scotland for a research scholarship.

Institut de Botanique
de l'université de Liège,
(Laboratoires de Physiologie végétale
et du Phytotron)
subsidié par l'I. R. S. I. A.

BIBLIOGRAPHY

Abbe, E. C., L. F. Randolph and J. Enset. — The developmental relationship between the shoot apex and the growth pattern of the leaf blade in diploid maize. *Amer. Jour. Bot.* **28**, 778 (1941).

Bassam, J. A. and M. Calvin. — The path of carbon in photosynthesis. Prentice Hall Inc. (1957).

Becker, T. — Wuchstoff und Säureschwankungen bei Kalanchoe blossfeldiana in versciedenen Licht-Dunkelnwechseln. *Planta* **43**, 1 (1953).

Bennet-Clark, T. A. — The role of organic acids in plant metabolism. *New Phytol.* **32**, 37, 128, 197 (1933).

Berry, L. J. — The influence of oxygen tension on the respiratory rate in different segments of onion roots. *J. Cell and Comp. Physiol.* **33**, 41 (1949).

Betz, A. — Zur Atmung Wachsender Wurzelspitzen, III Das verhalten in Stickstoff und Hochprozentiger Saurestoffatmosphäre : Die Pasteur. Reaktion. *Planta* **50**, 122 (1957).

Betz, A. — Aerobe Gärung und Athänol Umsatz. *Nat. Wiss.* **44**, 88 (1958).

Blaauw, A., A. Hartsema and E. Huysman. — Temperatur en strekkingsperiode van de Narcis, I. *Proceed. Kon. Neder. Akad. Wetensch. Amsterdam*, **35**, 803 (1932).

Bode, O. — Über Zusammenhänge zwischen CO_2 assimilation und photoperiodismus bei Kalanchœ blossfeldiana. *Planta* **33**, 278 (1942).

Bonner, J. — Further experiments on flowering in Xanthium. *Bot. Gaz.* **110**, 625 (1949).

Bonner, J. — Plant biochemistry. Academic Press Inc. New York, 1950.

Bonner, J. and D. Bonner. — Note on induction of flowering in Xanthium. *Bot. Gaz.* **110**, 154 (1948).

Bonner, J. and J. Thurlow. — Inhibition of photoperiodic induction by applied auxin. *Bot. Gaz.* **110**, 613 (1949).

Bonnier, G. — Recherches expérimentales sur l'adaption des plantes au climat alpin. *Ann. Sc. Nat.* (Bot.) **20**, 217 (1895).

Borthwick, H. A. and M. W. Parker. — Effectiveness of photoperiodic treatments of plants of different age. *Bot. Gaz.* **100**, 245 (1938).

Borthwick, H. A., M. W. Parker and P. H. Heinze. — Influence of localised low temperature on biloxi soybean during photoperiodic induction. *Bot. Gaz.* **102**, 792 (1941).

Borthwick, H., S. Hendricks and M. Parker. — Action spectrum for the photoperiodic control of floral initiation of a long day plant Wintex barley *(Hordeum vulgare)*. *Bot. Gaz.* **110**, 103 (1948).

Borthwick, H. A., S. B. Hendricks and M. W. Parker. — The reaction controlling flower initiation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **38**, 929 (1952).

Borthwick, H. A., S. B. Hendricks,M. W. Parker, E. H. Toole and V. K. Toole. — A reversible photoreaction controlling seed germination *Proc. Nat. Acad. Sci.*,**38**, 662 (1952).

Borthwick, H. A., S. B. Hendricks, E. H. Toole and V. K. Toole. — Action of light on lettuce germination. *Bot. Gaz.*, **115**, 205 (1954).

Bouillenne, R. — Les racines échasses de *Iriartea exorrhyza* Mart. et de Pandanus div. spp. (Pandanacées). *Mém. Acad. Roy. Belg.* (Classe Sc.) **8**, (5) (1927).

Bouillenne, R. — Anatomical data for the study of growth differentiation in higher plants. *Plant. Phys.*, **3**, 459 (1928).

Bouillenne, R. et M. Bouillenne-Walrand. — La sexualité et les oxydations cellulaires chez *Mercurialis annua* L. *Bull. Ac. Roy. Belg.*, XVI, 8, Bruxelles, 1930.

Bouillenne, R. et M. Bouillenne-Walrand. — Oxydations cellulaires et teneurs en sucres dans les deux sexes de *Mercurialis annua* L. *Bull. Acad. Roy. Sc. Belg.*, XVII, Bruxelles, 1931.

Bouillenne, R., M. Bouillenne et L. Ghenne. — Étude comparative du métabolisme des carbohydrates chez les mâles et chez les femelles de *Mercurialis perennis*. *Archives Inst. Bot. Liège*, 12 (1935).

Bouillenne, R. et F. Demaret. — Échanges respiratoires en fonction de l'hydration de *Bryonia dioica* L. au cours du cycle végétatif. *Annales de Physiologie*, 11, 5, Paris (1935).

Bouillenne, R., P. Kronacker et J. de Roubaix. — Étapes morphologiques et chimiques dans le cycle végétatif de la betterave sucrière. Inst. Belg. Amélior. Betterave, Tirlemont, 3, 87 (1940).

Bouillenne, R. — Phytobiologie, 786 p., H. Vaillant-Carmanne, Liège et Masson et Cie, Paris (1946).

Bouillenne, R. et M. Bouillenne-Walrand. — Le Phytotron de l'Institut Botanique de l'Université de Liège. *Archives de l'Institut de Botanique de Liège*, 20, 2 (1950).

Bouillenne, R. et M. Fouarge. — Étude d'un nouveau type d'éclairage fluorescent en serre (Phytor I. CRHLg.) pour la culture en serre (Laitues, Choux, Tomates). *Bull. Hort.* (Liège), 8, 3 (1953).

Bouillenne, R. — Hormones végétales, organogenèse et sexualité. Extrait du *Bulletin de l'Académie Royale de Belgique*, 16 décembre 1955.

Bouillenne, R. — Phytotron appareil à faire des climats. *Revue Chaleur et Climats*, décembre, 1958.

Bouillenne, R. — Aspects récents de la physiologie de la floraison. *Acad. Roy. Belg.*, V. XLVI (1960).

Brachet, J. — La détection histochimique des acides pentosenucléiques. *C. R. Soc. Biol.*, **133**, 88 (1946).

Brian, P. W. — Role of gibberellin like hormones in regulation of plant growth and flowering. *Nature*, **181**, 1122 (1958).

Bukatsch, F. — Tagesschwankungen des Blattgrüngehaltes alpiner Pflanzen II. *Zeitschr. fur gesamte Naturwiss.*, **6**, 197 (1940).

Bünning, E. — Die endonome Tagesrhytmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion. *Ber. Deutsch. Bot Gesellschaft*, **54**, 590 (1936).

Bünning, E. — Über die photophile und skotophile Phase der endogen Tagesrhythmik. *Planta*, **38**, 521 (1950).

Bünning, E. — Entwicklungs und Bewegungsphysiologie der Pflanze. Springer Verlag, Berlin, 1953.

Buvat, R. — Stucture, évolution et fonctionnement du méristème apicale de quelques dicotyledones. *Ann. Sci. Nat. Bot. XI*, **13**, 199 (1952).

Buvat, R. — Le méristème apicale de la Tige. *L'Année Biologique ?rd series*, **31**, 595 (1955).

Cajlachan, M. C. — The age of the plant and the photoperiodic reaction. *Comp. Rend. Acad. Sci. U.R.S.S.*, **6**, 306 (1933).

Cajlachan, M. C. — Photoperiodism of different parts of the leaves, its halves. *Comp. Rend. Acad. Sci. U.R.S.S.*, **47** (1945).

Carr, D. J. — On the nature of photoperiodic induction. *Physiol. Plant.*, **10**, 249 (1957).

CHEUVART, C. — Expériences sur le développement de *Cannabis sativa* L. (sexualité et pigments foliares) à température constante et sous différents régimes de photoperiodisme. *Bull. Acad. Roy. Belg.*, **40**, 1152 (1954).

CHOUARD, P. — Pourquoi fleurissent les plantes ? Les conférences du Palais de la découverte, Paris, 1949.

CLAUSS, H. und B. SCHWEMMELE. — Substanz production und chlorophyll bildungen von Keimpflanzen in 72 Stunden-Zyklen mit aufgeteiltes Lichtphase. *Z. f. Bot.*, **47**, 226 (1959).

CURTIS, O. F. and H. I. CHANG. — The relative effectiveness of the temperature of the crown as contrasted with that of the rest of the plant upon the flowering of the celery plant. *Amer. jour. Bot.*, **17**, 1047.

DARWIN, C. — Variation of animals and plants in domestication. John Murray Albemarle St., London, 1868.

DENFFER, von D. — Über die Bedeutung des Blühtermins der Wirtspflanzen von *Cuscuta gronovii* Willd. für die Blutenbildungen des Scmarotzers. *Biol. Zbl.*, **67**, 175.

DENFFER, von D. — Blüthormone oder Bluhemmung. *Naturwiss.*, **37**, 296 (1950).

DENNY, F. E. — Semi-micro method for measuring the amount of oxygen consumed and carbon dioxide produced in plant respiration. *Contrib. Boyce Thomp. Inst.*, **15**, 47 (1948).

DE ZEEUW, D. — Doctoral thesis, Wageningen, cited by Wellensiek, S., H. Doorenbos and De Zeuuw, in « The mechanism of photoperiodism », 8th Congress of Bot. Paris Reports and communications sections 11 and 12, 307 (1954).

DIELS, D. — Jugendformen und Blühreife in Pflanzenreich. Berlin, 1906.

DIXON, M. — Manometric methods. Cambridge Univ. Press, 1952.

DOSTAL, R. und M. HOSEK. — Über den Einfluss von Heteroauxin auf der morphogenese bei Circaea (das Sachssche Phänomen). *Flora*, **31**, 263, (1936).

ELLIOT, B. B. and A. C. LEOPOLD. — A relation between photoperiodism and respiration. *Plant. Phys.*, **27**, 787 (1952).

FABIAN, J. — Beitrage zum Lang und Kurztagsproblem. *Z. f. Bot.*, **33**, 305, (1938).

FIGDOR, W. — Übergangbildung von Pollen zu Fruchtblättern bei *Humulus japonicus* und deren Ursachen. Sitsungsber. Kais. Akad. Wiss. Wien. *Math. Nat. Klasse*, **120**, 689, (1911).

FLINT, L. H. — Light in relation to dorancy germination in lettuce seed. *Science*, **80**, 38 (1934).

FUNKE, C. — The photoperiodicity of flowering under short day with supplemental light of different wavelengths. Vernalisation and Photoperiodism, 79 (1948).

GALSTON, A. — Adaptive enzymes, endogenous rhythms and photoperiodic behaviour of plants. 8th Congress of Bot. Paris Reports and communications sections 11 and 12, 326 (1954).

GARDNER, F. P. and W. E. LOOMIS. — Floral induction and development in orchard grass. *Plant Phys.*, **28**, 201 (1953).

GARNER, W. W. and H. A. ALLARD. — Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *jour. Agr. Res.*, **18**, 553 (1920).

GARNER, W. W. and H. A. ALLARD. — Further studies in photoperiodic response of the plant to relative length of day and night. *jour. Agr. Res.*, **23**, 871 (1923).

GARNER, W. W. and H. A. ALLARD. — Duration of the flowerless condition of some plants in response to unfavourable lenghts of day. *jour. Agr. Res.*, **43**, 439 (1931).

GASSNER, G. — Beitrage zur physiologischen Characteristik Sommer und Winter annualer Gewächse in besondere der Getreidepflanzen. *Z. f. Bot.*, **10**, 417 (1918).

GIFFORD, E. M. — The shoot apex in angiosperms. *Bot. Rev.*, **20**, 477 (1954).

GILSON, M. — Évolution quantitative de l'acide beta indole-acétique chez *Hyosciamus niger*, en rapport avec la sexualisation et la floraison. *Bull. Acad. Roy. Belg. Classe Sci. 5th series*, **43**, 778 (1957).

GRAINGER, J. — Growth cycle metabolism of plants in relation to flowering. *Ann. Appl. Biol. G. B.*, **35**, 624 (1941)

GRÉGOIRE, V. — La morphogenèse de l'appareil floral. *La cellule*, **47**, 287 (1938).

GREGORY, F. G., I. SPEAR and K. V. THIMANN. — The interrelation between CO_2 metabolism and photoperiodism in Kalanchoe. *Plant Physiol.*, **29**, 210 (1954).

HABERMANN, H., H. RAYMOND and H. WALLACE. — Transfer of flowering stimulus from stock to scion in grafted *Helianthus annuus* L. *Aler. üour. Bot.*, **45**, 479 (1958).

HAMNER, K. C. — Interrelation of light and darkness in photoperiodic induction. *Bot. Gaz.*, **101**, 658 (1940).

HAMNER, K. C. and J. BONNER. — Photoperiodism in relation to hormones as factors in floral initiation and development. *Bot. Gaz.*, **100**, 388 (1938).

HARDER, R. — Vegetative and reproductive development of *Kalanchoe blossfeldiana* influenced by photoperiodism. In Growth in relation to differentiation and morphogenesis, **117**. Cambridge, 1948.

HARDER, R. and O. BODE. — Über die Wirkung von Zwischenbelichtungen während der Dunkelperiode auf das Blühen die Verlaubung und die Blattsukkulenz bei der Kurztagspflanze *Kalanchoe blossfeldiana*. *Planta*, **33**, 476 (1943).

HARDER, R. — O. BODE und H. VON WITSCH. — Photoperiodische untersuchungen in Kohlensäurefreier Atmosphäre bei der Kurztagspflanze *Kalanchoe blossfeldiana*. *Jahrb. Wiss. Bot.*, **91**, 381 (1944).

HARDER, R. und V. SENDEN. — Antagonistische Wirkung von Wuchstoff und Blüthormon. *Naturwiss.*, **36**, 348 (1949).

HARDER, R. und B. SPRINGORUM. — Beobachtung über Metaplasin und Blühhormonwirkungen bei Rudbeckia. *Biol. Zbl.*, **66**, 145 (1947).

HARDER, R. und H. VON WITSCH. — Weitere Untersuchungen über die Veränderung der photoperiodische Reaktion von *Kalanchoe blossfeldiana* mit zunehmenden Alter der Pflanzen. *Planta*, **32**, 547 (1942).

HARDER, R. und H. VON WITSCH. — Über photoperiodische bedingte-Organ und Gestaltbildung bei den Pflanzen. *Naturwiss.*, **33**, 41 (1946).

HEINZE, P. H., M. W. PARKER and H. A. BORTHWICK. — Floral initiation in biloxi soya bean as influenced by grafting. *Bot. Gaz.*, **103**, 518 (1942).

HENDRICKS, S. B., H. A. BORTHWICK and R. J. DOWNS. — Pigment conversion in the formative responses of plants to radiation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (Wash.), **42**, 19 (1956).

HIBBARD, A. — Photoperiodism and enzyme activity in the soybean plant. *Univ. Miss. Agr. Exp. Station Res. Bull.*, 271 (1937).

HILLMAN, W. S. and A. W. GALSTON. — Inductive control of indole acetic acid oxidase by red and near infra red light. *Plant Phsiol.*, **32**, 129 (1957).

HOLDSWORTH, M. and O. V. S. HEATH. — Studies in the physiology of the onion plant. IV The influence of day length and temperature of the flowering of the onion plant. *J. Exptl. Bot.*, **1**, 353.

HOLDSWORTH, M. and P. S. NUTMAN. — Flowering responses in a strain of *Orobanche minor*. *Nature*, **180**, 223 (1947).

HUBBENET, E. — Verdissement en lumière intermittente. Symposium dedicated to V. N. Lubimenko., **43**, Kiev., 1938.

JAMES W. O. and I. P. NORVAL. — The respiratory decomposition of pyruvic acid by barley. *New Phytol.*, **37**, 455 (1938).

JAMES, W. O. — Plant respiration. Oxford Clarendon Press, 1953.

JENNINGS, P. R. and R. K. ZUCK. — The cotyledon in relation to photoperiodism in cocklebur. *Bot. Gaz.*, **116**, 199 (1954).

JOHNSON, M. J. — Isolation and properties of pure yeast polypeptidease. *J. Biol. Chem.*, **137**, 575 (1941).

KANDLER, O. — Untersuchungen über den Einfluss von Substratzuführ auf den Abbau Zelleigenen Materials bei C^{14} Markierter Chlorella. *Planta*, **51**, 167 (1958).

KANDLER, O. — Zur Frage einer Aeroben Gärung in Wurzelmeristem. *Planta*, **51**, 544 (1958).

KANDLER, R. — Über die Blütenbildung bei *Lemna gibba* L. I Kulterbedingungen und Tageslangeabhängigkeit. *Z. f. Bot.*, **43**, 61 (1955).

KATUNSKY, V. M. — Dependancy of photoperiodic reactions of plants on the spectral composition of light. *Comp. Rend. Acad. Sci. U.R.S.S.*, **15**, 500 (1937).

KHUDAIRI, A. and K. C. HAMMER. — The relative sensitivity of Xanthium leaves of different ages to photoperiodic induction. *Plant Physiol.*, **29**, 251 (1954).

KIDD, F., C. WEST and G. E. BRIGGS. — A quantitative analysis of the growth of *Helianthus annuus*. Part I. The respiration of the plant and of its parts throughout the life cycle. *Proc. Roy. Soc.* (London) B., **92**, 368 (1921).

KLEBS, G. — Über die Blütenbildung von Sempervivum. *Flora*, **111**, 128 (1918).

KNOTT, J. — Effect of localised photoperiod on spinach. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sc.*, **31**, 152 (1934).

KONINGSGERGER, V. J. — Proceedings of the First International Photobiological Congress. Amsterdam, 1954.

KUNITAKE, G. M., P. SALTMAN and A. LANG. — The products of CO_2 fixation in leaves of long and short day treated *Kalanchoe blossfeldiana*. *Plant Physiol.*, **32**, 201 (1957).

LAIBACH, F. und F. J. KRIBBEN. — Der einfluss von Wuchstoff auf die Blutenbildung der Gurke. *Naturwiss.*, **37**, 114 (1950).

LANCE, A. — Sur la structure et le fonctionment du point végétatif du *Vicia faba*. *Ann. Sci. Nat. Bot.*, **11**, 301 (1952).

LANG, A. — Physiology of flowering. *Ann. Rev. Pl. Phys.*, **3**, 265 (1952).

LANG, A. und G. MELCHERS. — Die photoperiodische Reaktion von *Hyoscyamus niger*. *Planta*, **33**, 653 (1943).

LANGSTON, R. and A. C. LEOPOLD. — Effect of photoinduction on some B vitamins in Wintex barley. *Physiol. Plant.*, **7**, 397 (1954).

— The dark fixation of carbon dioxide as a factor in photoperiodism. *Plant Physiol.*, **29**, 436 (1954).

LEOPOLD, A. C. and F. S. GUERNSEY. — Respiratory responses to red and infra red light. *Physiol. Plant.*, **7**, 36 (1954).

LIVERMAN, J. L. — The physiology of flowering .*Ann. Rev. Pl. Phys.*, **6**, 177 (1955).

LYSSENKO, T. — Les bases théoriques de la vernalisation, Agrobiologie, Moscou, 1952.

LIVERMAN J. L. and BONNER J. (1953) and LIVERMAN, J. L. and A. LANG. — Induction of flowering in long day plants by applied indole acetic acid. *Plant Physiol.*, **31**, 147 (1956-1957).

LOEHWING, W. — Locus and physiology of photoperiodism perception in plants. *Proceed. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **37**, 631, (1938).

LÖHR E. — R. Q. and Q 10^{o} in Stämmen von Buchen. *Physiol. Plant.*, **10**, 340.

LONA, F. — La fioritura del a brevidiurna *Chenopodium amaranticolor* Coste et Regn. coltivato in soluzione nutrizia con saccarosi, in assenza di stimulo fotoperiodico euflorigeno. *Nuovo Giorn. Bot. Ital.*, **56**, 559 (1948).

LONA, F. — La fioritura della brevidiurna a notte continua. *Nuovo Giorn. Bot. Ital.*, **57**, 479 (1949).

LUBIMENKO and HEIBBENET (1932).

MELCHERS, G. — La fisiologia della fioritura un capitolo della fisiologia generale dello sviluppo. *Rend. Instituto Lombardo di Scienze e Lettere*, **83** (1950).

MELCHERS, G. und A. LANG. — Weitere Untersuchungen zur Frage der Blühhormone. *Biol. Zentrlbl.*, **61**, 16 (1941).

— Auslosung von Blütenbildungen bei der Langtagpflanze *Hyoscyamus niger* in Kurztagbedingungen durch Infiltration der Blätter mit Zuckerlösung. *Naturwiss.*, **30**, 589 (1942).

— Die Physiologie der Blütenbildung. *Biol. Zentrlbl.*, **67**, 105 (1948).

Millington, W. F. and E. L. Fisk. — Shoot development in *Xanthium pennsylvanicum*. I The vegetative plant. *Amer. Journ. Bot.*, **43**, 655 (1956).

Mitchell, K. J. — Influence of light and temperature on the growth of ryegrass (lolium spp.). *Physiol. Plant.*, **6**, 21 (1953).

Mohr, H. — Die Beeinflussung der Keimung von Farnsporen durch Licht und andere Faktoren. *Planta*, **46**, 534 (1956).

Mohr, H. — Der Einfluss monochromatischer Strahlung auf das Langenwachstum des Hypocotyls und auf die Anthocyanbildung bei Keimlingen von Sinapis alba L. (Brassica alba Boiss.). *Planta*, **49**, 384 (1957).

Mohr, H. — Der Lichteinfluss auf das Wachstum der Keimblatter bei Sinapis alba L. *Planta*, **53**, 219 (1959).

Monselise, S. P. and F. W. Went. — Effects of temperature on growth and dry matter accumulation of peas. *Plant Physiol.*, **33**, 372 (1958).

Murneek, A. E. — Biochemical studies of photoperiodism in plants. *Miss. Agr. Exp. Station Res. Bull.*, **268**, 1 (1937).

Murneek, A. E. — Length of day and temperature effect on Rudbeckia. *Bot. Gaz.*, **102**, 269 (1940).

— History of research in photoperiodism. in « Vernalisation and Photoperiodism, Murneek and Whyte, 1948.

Murneek, A. E. and R. O. Whyte. — Vernalisation and Photoperiodism. *Chronica Botanica Co. Waltham, Mass. U.S.A.* (1948).

Naylor, F. L. — Effect of length of induction period on floral development of *Xanthium pennsylvanicum*. *Bot. Gaz.*, **103**, 146 (1941).

Norris, L. and M. Calvin. — Comparison of early products of photosynthesis in long and short day Kalanchoe plants. *Proc. lst International* Photobiological Congress, 1954.

— Photoperiodism and photosynthetic CO_2 assimilation. *Annal. Acad. Sci. Fennicae. Series A II*, **60**, 32 (1955).

Parker M. W. and H. A. Borthwick. — Floral initiation in Biloxi soybeans as influenced by photosynthesis during the induction period. *Bot. Gaz.*, **102**, 256 (1940).

— Influence of temperature on photoperiodic reaction. *Bot. Gaz.*, **104**, 612 (1943).

— Influence of light on plant growth. *Ann. Rev. Plant Physiol*, **1**, 43 (1950).

Petit, J. — Sur la détermination du sexe chez Cannabis sativa L. dans les conditions expérimentales Phytotron de Liège. *Bull. Soc. Roy. Sci. Leige*, **11**, 464 (1952).

Philipson, W. R. — Studies in the development of the inflorescence. II The capitula of *Succisa pratensis* (Moench.) and *Dipsacus fullonum* L. *Ann. Bot. N. S.*, **11**, 285 (1947).

— Studies in the development of the inflorescence. IV The capitula of *Hieracium boreale* Fries. and *Dahlia gracilis* Ortcg. *Ann. Bot.*, **12**, 65 (1948).

Philipson, W. R. — Organisation of the shoot apex in dicotyledons. *Phytomorph.*, **4**, 70 (1954).

Popham, R. A. and A. P. Chan. — Origin and development of the receptacle of *Chrysanthemum moniflorum*. *Amer. Jour. Bot.*, **39**, 329 (1952).

Purvis, O. N. — An analysis of the influence of temperature during germination on the subsequent development of Winter cereals and its relation to the effect of length of day. *Ann. Bot.*, **48**, 919 (1934).

Purvis, O. N., and F. G. Gregory. — Studies in vernalisation of cereals. I. — A comparative study of vernalisation of Winter rye by low temperature and by short days. *Ann. Bot. N. S.*, **1**, 569 (1937).

Rau, W. — Über die Wirkung des zu verschiedenen Tageszeiten gebotenen Lichts auf Substanzproduktion und Stickstoffgehalt von Keimpflanzen. *Z. f. Bot.*, **42**, 305 (1954).

Resende, F. — Long short day plants. *Portug. Acta. Biol. A.*, **3**, 318.

Roberts, R. H. — Theoretical aspects of graftage. *Bot. Rev.*, **15**, 423 (1949).

— In « Plant growth substances », Skoog, 1951.

Roberts, R. H., J. E. Kraus and N. Livingston. — Carbon dioxide exchange rhythm and fruitfulness in plants of different reproductive habits. *Jour. Agr. Res.*, **54**, 319, (1937).

Roberts, R. H. and B. E. Struckmeyer. — The effect of temperature and other environmental factors upon the photoperiodic responses of some of the higher plants. *Jour. Agr. Res.*, **56**, 633 (1938).

Roberts, R. H. and B. E. Struckmeyer. — Further studies on the effect of temperature and other environmental factors upon the photoperiodic responses of plants. *Jour. Agr. Res.*, **59**, 699 (1939).

— The point of origin of the blossom inducing stimulus. *Science*, **90**, 16 (1939).

Ruhland, W. und K. Ramshorn. — Aerobe Gärung in aktiven pflanzlichten Meristemen. *Planta*, **28**, 471 (1938).

Sachs, J., (1882).

Sachs, J. — Stoff und Form der Pflanzenorgane. Vorlesung uber Pflanzen Physiologie. Leipzig Verlag Wilhelm Angelmann ,1887.

Sachs, R. M. — Floral initiation in *Cestrum nocturnum* a long short day plant. II. — A 24 hour versus a 16 hour photoperiod for long day induction. *Plant. Physiol.*, **31**, 429 (1956).

— Floral initiation in Cestrum nocturnum a long short day plant. III The effect of temperature upon long and short day induction. *Plant Physiol.*, **31**, 430 (1956b).

Salisbury, F. B. — The dual role of auxin in flowering. *Plant Physiol.*, **30**, 327 (1955).

— Growth regulators and flowering. I Survey methods. *Plant Physiol.*, **32**, 600 (1957).

Salisbury, F. B. and J. Bonner. — The reactions of the photoinductive dark period. *Plant Physiol.*, **31**, 141 (1956).

Schertz, F. — Seasonal variation of the chloroplast pigments in several plants of the Mall at Washington D. C. *Plant Physiol.*, **4**, 135 (1929).

Schmidt, A. — Histologische Studien an Phanerogamen Vegetationspunkten. *Bot. Arch.*, **8**, 345 (1924).

Schmitz, J. — Über Beziehungen zwischen Blütenbildung in verschiedenen Licht-Dunkelkombinationen und Atmungsrhythmik bei wechselnden photoperiodischen Bedingungen. *Plants*, **39**, 279 (1951).

Schöpfer. — Plants and vitamins. Chronica Botanica Co. Waltham, Mass., U. S. A., 1949.

Schwabe, W. W. — Factors controlling flowering of the Chrysanthemum. I The effects of photoperiod and temporary chilling. *Jour. Exptl. Bot.*, **1**, 329 (1950).

— Factors controlling flowering of Chrysanthemum. IV The site of vernalisation and translocation of the stimulus. *Jour. Exptl. Bot.*, **5**, 389 (1954).

Sen, S. P. and A. C. Leopold. — Influence of light and darkness upon carbon dioxide fixation. *Plant Physiol.*, **31**, 323 (1956).

Seybold, A. — Über die physiologische Bedeutung der Chorophyllkomponenten *a* und *b*. *Bot. Arch.*, **42**, 71 (1941).

Simone. — In press, Angewandte Chemie 1959.

Sironval, C. — Essai sur la floraison de *Begonia semperflorens* Link. et Otto. dans le Phytotron. *Bull. Soc. Roy. Sci. Liège*, **8-9-10**, 523 (1951).

— Recherches organographiques et physiologiques sur le développement du fraisier des quatre saisons à fruits rouges. *Mém. Acad. Roy. Belg.* (Classe Sci), **26**, fasc. 4 (1951b).

— Modification de la forme de la première feuille chez le fraisier. *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.*, **84**, 275 (1952).

— A propos du métabolisme de la chlorophylle dans la feuille (ses rapports avec la floraison). *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.*, **85**, 285 (1953).

— La photopériode et la sexualisation du fraisier des quatre saisons à fruits rouges. (Thèse de 1956). *Comp. Rend. I.R.S.I.A. Belgium*, **18**, February, 1957.

— Day length and haematin compounds in plants. *Nature*, **182**, 1170 (1958).

Skoog, F. — Plant growth substances, Ed. Univ. Wisc. Press Madison, 1951.

Snedecor, G. W. — Statistical methods. Iowa State College Press,1956.

Snyder, W. E. — Effect of light and temperature in floral initiationin Cocklebur and Biloxi Soybean. *Bot. Gaz.*, **102**, 302 (1940).

Spear, I and K. V. Thimann. — The interrelation between CO_2 metabolism and photoperiodism in Kalanchoe. II Effect of prolonged darkness and high temperatures. *Plant Physiol.*, **29**, 414 (1954).

Sterling, C. — Growth and vascular development in the shoot apex of Sequoia sempervirens (Lamb.) Endl. III Cytological aspects of vascularization. *Amer. Jour. Bot.*, **33**, 35 (1946).

Strott, A. — Der Einfluss der Umweltbedingungen auf die Ausbildung der Chloroplastenfarbstoffe. *Jahrb. Wiss. Bot.*, **86**, 1 (1938).

Struckmeyer, B. E. — Structure of stems in relation to differentiation and abortion of blossom buds. *Bot. Gaz.*, **93**, 182 (1941).

— Histological aspects of the changes from a vegetative to a flowering state. *Amer. Naturalist*, **84**, 135 (1950).

Taranez, A. — Absorption de la lumière par la chlorophylle et rétention d'eau par les tissus en rapport avec la réaction photopériodique des plantes. *Ann. Sci. Nat. (Bot.) 11th series*, **110**, 21 (1950).

Thein, M. M. — Survey of anatomical and micro-chemical changes in the shoot of *Xanthium pennsylvanicum* in relation to photoperiodism. *Amer. Jour. Bot.*, **44**, 514 (1957).

Thomas, M. — Physiological studies in acid metabolism in green plants. I CO_2 fixation and CO_2 liberation in Crassulacean acid metabolism. *New Phytol.*, **48**, 390 (1949).

Tournois, J. — Anomalies florales du houblon japonais et du chanvre déterminées par les semis hâtifs. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **153**, 1017 (1911).

— Influence de la lumière sur la floraison du houblon japonais et du chanvre. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **155**, 297 (1912).

— Études sur la sexualité du houblon. *Ann. Sc. Nat. (Bot.) 9th series*, **19**, 49 (1914).

Troupin, G. — Action de la lumière et de la température sur la croissance et la sexualité des mâles et des femelles de *Mercurialis* annua L. *Growth*, **10**, 343 (1946).

Umbreit, W. W., R. H. Burris and J. F. Stauffer. — Manometric techniques. Burgess Publishing Co, 1957.

Virgin, H. I. — The conversion of protochlorophyll to chlorophyll *a* in continuous and intermittent light. *Phys. Plant.*, **8**, 389 (1955).

— Studies on the formation of protochlorophyll and chlorophyll *a* under varying light conditions. *Phys. Plant.*, **11**, 374 (1958).

Wanner, H. — The zonal graduation of respiratory activity in the root. *Arkiv. f. Bot.*, **31**, 1 (1944).

— Sauerstoffdiffusion als begrenzender Faktor der Atmung von Pflanzenwurzeln. *Vierteljahrsschr. Naturf. Ges. Zurich.*, **90**, 98 (1945).

Warburg, O. — Ideen zur Fermentchemie der Tumoren. Abhandlungen der Deutschen Akad. Wiss. Berlin No. 3, 1947.

— On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, **124**, 269 (1956).

Wendel, K. — Tagesschwankungen des Blattgrungehaltes bei Pflanzen ebener Standorte. *Zeitschr. f. gesamte Naturwiss.*, **6**, 327 (1940).

Went, F. W. — Thermoperiodicity, in Vernalisation and photoperiodism Murneek and Whyte, 1948.

Went, F. W. and H. M. Hull. — The effect of temperature on the transolcation of carbohydrates in tomato plants. *Plant. Physiol.*, 24, 505 (1949).

Went, F. W. — The effect of temperature on plant growth. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **4**, 347 (1953).

— The experimental control of plant growth. Chronica Botanica Co. Waltham, Mass., U. S. A., 1957.

Willstatter, R. und A. Stoll. — Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensaure. Berlin, 1918.

Withrow, R. and H. Benedict. — Photoperiodic response of certain greenhouse annuals as influenced by intensity and wavelength of

artificial light used to lengthen the day light period. *Plant. Physiol.*, **11**, 225 (1936).

WITSCH, H. VON. — Über den Einfluss der Tageslange auf der Farbstoff und Aneuringehalt der Blätter von Lang und Kurztagpflanze. *Z. f. Bot.*, **47**, 121 (1959).

YEMM, E. W. — The respiration of barley plants. I Methods for the determination of the carbohydrate in leaves. *Proc. Roy. Soc. B.*, **117**, 483 (1935).

— The respiration of barley plants. III Protein catabolism in starving leaves. *Proc. Roy. Soc. B.*, **123**, 243 (1937).

ZELLER, A. — Untersuchung über Chlorophyllgehalt, Trockengewicht und Aschengehalt in Abhängigkeit von Seehöhe und Jahreszeit. *Beih. Bot. Zntrlblt.*, **54**, 19 (1935).

ZEEVART, J. A. D. — Flower formation as studied by grafting. Doctoral thesis Wageningen, 1958.

ZIERACKS, H. — Über Bluteninduktion durch Keim- und Primätblattern. *Biol. Zntrlblt.*, **71**, 201 (1952).

Bull. Soc. Royale Sciences Liège, 30° année, n° 11-12 1961, pp. 496-511

ÉTUDE D'UNE TOURBE A SCHEUZERIA PALUSTRIS DANS LES COUCHES INFÉRIEURES DES DÉPOTS DE LA FAGNE WALLONNE (*)

par R. SCHUMACKER
Assistant Univ. Lg.

Introduction

En 1957, M. Streel publiait une note (**) sur la découverte d'une tourbe à *Narthecium ossifragum* dans les couches anciennes de la tourbière de la Fagne Wallonne. D'après cet auteur, cette assise est visible sur plus de 500 m. le long de la tranche d'exploitation, du flanc S-W de la tourbière. Il en donnait la diagnose suivante : « A l'état subfossile, cette couche se caractérise par une stratification très serrée de structures lamellaires, dans laquelle les rhizomes apparaissent laminés et se confondent facilement avec le feutrage homogène des feuilles. Isolé de ce feutrage, ces rhizomes présentent toutes les caractéristiques morphologiques des rhizomes de *Narthecium ossifragum* ».

Nous avons étudié d'une manière approfondie les structures conservées à l'état subfossile et les pollens de cette assise de tourbe ; nous avons examiné également les assises qui l'enserrent.

Position stratigraphique des couches étudiées.

Les trois assises de tourbe étudiées constituent la partie inférieure de la tourbière reposant sur une argile décolorée. En Fagne Wal-

(*) Présenté par M. M. Bouillenne et Moureau, le 15 juin 1961.

(**) Cette note visait surtout à montrer qu'à la période atlantique, une formation végétale, d'un type différent de celles qui dans l'ensemble caractérisent les tourbières hautes à sphaignes dans notre pays, devait couvrir de grandes surfaces sur le flanc NE du sommet de Botrange. Cette formation était sans doute liée à la présence d'un plan d'eau proche de la surface du sol, dû aux nombreuses sources (Bouillenne 1933) qui entourent la calotte limoneuse du sommet.

lonne, tout au moins le long de la tranche d'exploitation, on trouve directement en contact avec le sol, une première couche de tourbe riche en débris de *Betula* (couche A). La couche « à *Narthecium ossifragum* » décrite par Streel (couche B) se situe immédiatement au dessus de cette tourbe à *Betula*. Elle a une épaisseur moyenne de 50 cm. Elle est limitée dans sa partie supérieure par une assise de tourbe riche en brindilles de *Betula* et *Vaccinium* (couche C). La base de cette dernière couche est parfois limitée par un lit compact de brindilles.

D'après Streel (1959), la couche A se serait formée à la fin du Boréal (VII), la couche B, en pleine période Atlantique (VIIIa) et la couche C au début du Subboréal (IX).

Nous avons tout d'abord examiné les structures végétales conservées dans les couches A, B et C. Nous avons ensuite procédé à l'analyse pollinique complète d'échantillons de tourbe prélevés à trois niveaux dans la tranche Sud de la tourbière exploitée :

Niveau 1 : couche A à 220 cm de profondeur (partie supérieure).

Niveau 2 : couche B à 170 cm de profondeur (milieu de couche).

Niveau 3 : couche C à 110 cm de profondeur (partie inférieure de la couche).

I. Morphologie et anatomie des structures végétales conservées et attribuées a *Narthecium ossifragum*

Les analyses ont montré que les structures fossiles que Streel attribuait à *Narthecium ossifragum* étaient strictement limitées à la couche B et qu'on n'en trouvait nulle trace dans les couches A et C.

A. *Morphologie.*

Lorsque l'on examine des échantillons frais de la tourbe prélevée dans la couche B, on est frappé par l'uniformité des structures que l'on y trouve : un feutrage dense de rhizomes et surtout de feuilles laminées sous le poids de la tourbe.

Les rhizomes, qui peuvent atteindre 7 à 8 cm de long, présentent une série de nœuds et d'entrenœuds distants de 0,5 à 1,5 cm ; les nœuds sont particulièrement visibles par la protubérance qu'ils provoquent autour de la tige et par les feuilles qui viennent s'y insérer.

Les feuilles sont mal conservées sans doute à cause de leur struc-

ture plus fragile. Le limbe est fortement applati ; il est large de 5 à 8 mm et long de 10 à 20 cm ; il est parcouru par une série de nervures parallèles et de même importance.

En disséquant soigneusement un bloc de ce feutrage, nous avons pu observer à plusieurs reprises des plantes munies d'une hampe terminée par une infrutescence en grappe lâche. Dans certains cas nous avons trouvé des fruits en contact avec les courts pédicelles floraux. La comparaison avec ceux de *Scheuzeria palustris* et de *Narthecium ossifragum* actuels nous permet d'éliminer *Narthecium*. En effet, les graines de cette plante sont minuscules, alors que celles trouvées en contact avec les hampes florales atteignent 3-4 mm de long et 2 mm de large et sont en forme de graines de haricots. Elles ressemblent typiquement aux graines des échantillons d'herbiers de *Scheuzeria palustris*.

En résumé, macroscopiquement, les rhizomes ne permettent pas une identification sûre de la plante à laquelle ils ont appartenu. D'autre part, la comparaison des hampes florales et des graines trouvées à leur contact, avec des échantillons d'herbiers, nous a permis d'établir une ressemblance frappante avec celles de *Scheuzeria palustris*.

B. *Structure anatomique des rhizomes.*

Nous avons étudié la structure anatomique des rhizomes fossiles, prélevés dans la couche B, parallèlement à celle des rhizomes de *Narthecium ossifragum* et de *Scheuzeria palustris* actuels (*).

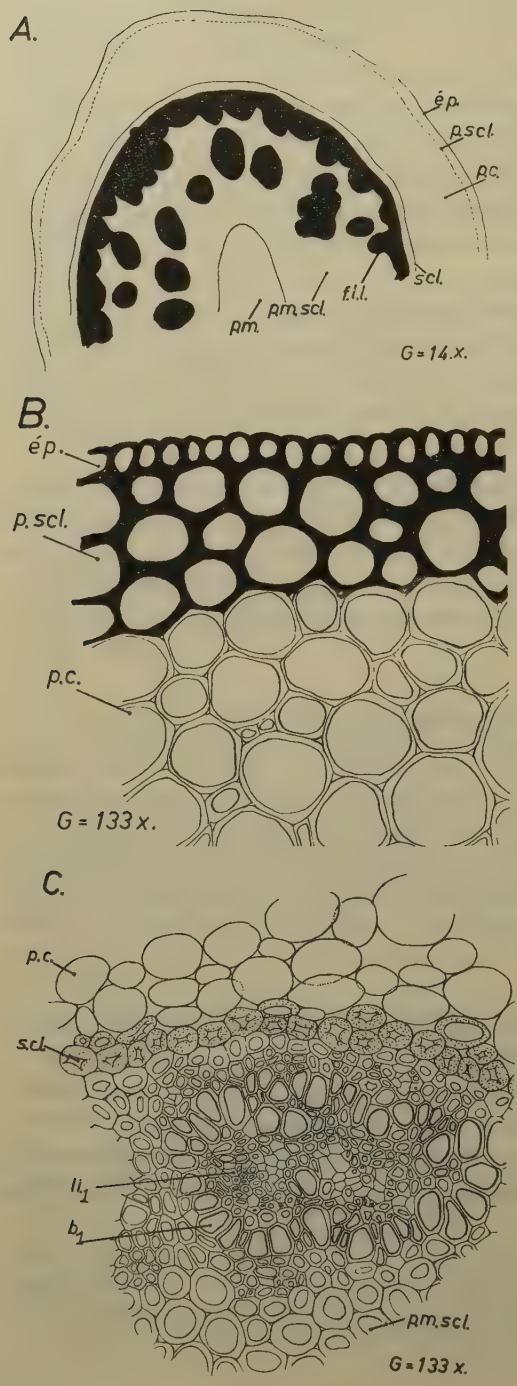
Nous avons choisi des rhizomes sensiblement de même diamètre pour chaque échantillon et nous y avons pratiqué une série de coupes transversales au microtome à main. Les coupes traitées 30 minutes au liquide éclaircissant sont fixées à l'acide acétique à 40 % et coloré au carmin aluné de Grenacher.

Les planches I, II et III montrent la structure des trois échantillons et en facilitent la comparaison.

Plusieurs caractères différencient nettement les coupes dans le rhizome de la plante fossile et de *Narthecium ossifragum* vivant :

1. Relativement à l'ensemble de la coupe, la stèle est beaucoup plus importante chez *Narthécium* que chez la plante fossile (pl. I et II ; A).

(*) Les rhizomes de *Narthecium* proviennent de la Fagne Wallonne, tandis que ceux de *Scheuzeria* ont été recueillis sur une tourbière suédoise par Streel (1956).



Légende ·

ép.	épiderme.
p. c.	parenchyme cortical.
p. l.	parenchyme à lacunes aérifères.
p. scl.	parenchyme sclérifié.
p. m.	parenchyme médullaire.
p. m. l	parenchyme médullaire à lacunes aérifères.
p. m. scl.	parenchyme médullaire sclérifié.
scl.	sclérenchyme.
l.	lacunes aérifères.
f. l. l.	faisceaux libéroligneux.
$li._1$	liber primaire.
$b._1$	bois primaire.

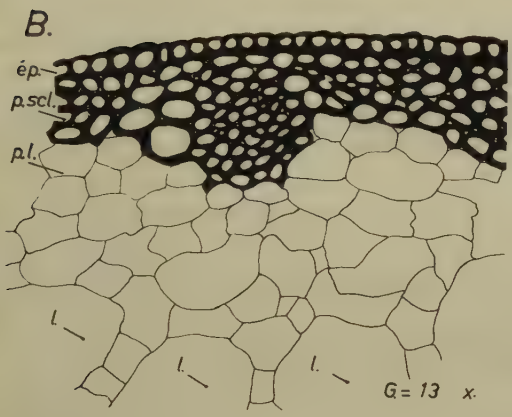
PLANCHE I.

Coupe transversale dans le rhizome de Narthecium ossifragum.

a. Schéma général de la coupe.

b. Détail du parenchyme cortical.

c. Détail du système vasculaire.



Légende :

ép.	épiderme.
p. c.	parenchyme cortical.
p. l.	parenchyme à lacunes aérifères.
p. scl.	parenchyme sclérifié.
p. m.	parenchyme médullaire.
p. m. l	parenchyme médullaire à lacunes aérifères.
p. m. scl.	parenchyme médullaire sclérifié.
scl.	sclérenchyme.
l.	lacunes aérifères.
f. l. l.	faisceaux libéroligneux.
$li._1$	liber primaire.
$b._1$	bois primaire.

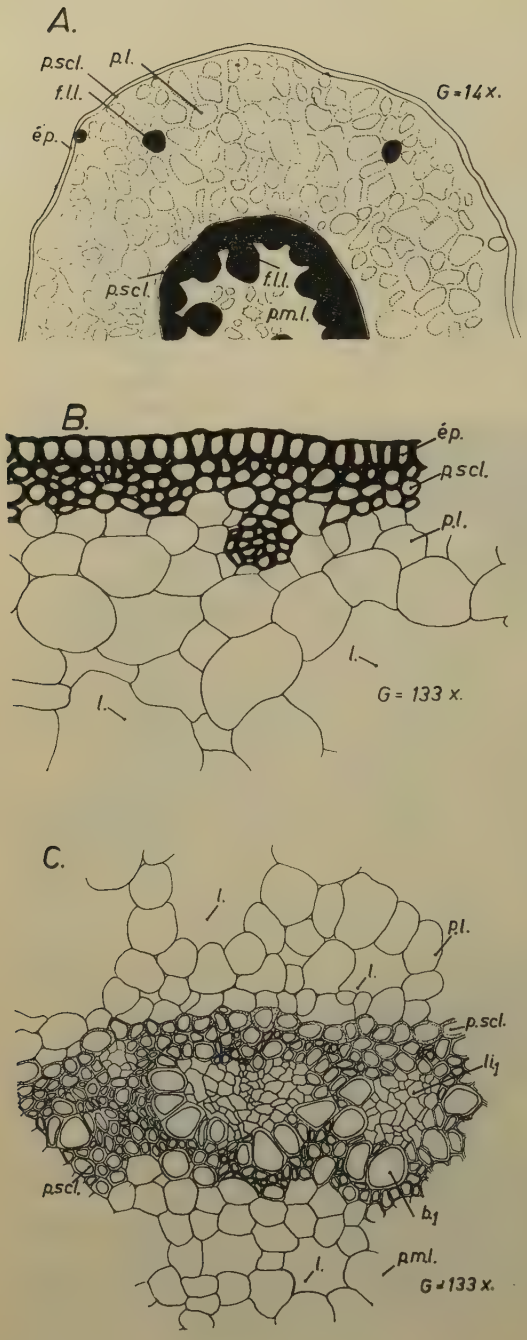
PLANCHE II.

Coupe transversale dans le rhizome de la plante fossile.

a. Schéma général de la coupe.

b. Détail du parenchyme cortical.

c. Détail du système vasculaire.



Légende :

ép.	épiderme.
p. c.	parenchyme cortical.
p. l.	parenchyme à lacunes aérifères.
p. scl.	parenchyme selérifié.
p. m.	parenchyme médullaire.
p. m. l	parenchyme médullaire à lacunes aérifères.
p. m. scl.	parenchyme médullaire sclérifié.
scl.	sclérenchyme.
l.	lacunes aérifères.
f. l. l.	faisceaux libéroligneux.
$li._1$	liber primaire.
$b._1$	bois primaire.

PLANCHE III.

Coupe transversale dans le rhizome de Scheuzeria palustris.

a. Schéma général de la coupe.

b. Détail du parenchyme cortical.

c. Détail du système vasculaire.

2. Les parenchymes médullaire et cortical de *Narthecium* sont de simples parenchymes à méats, tandis que le parenchyme cortical du rhizome fossile présente de nombreuses lacunes aérifères du type de celles que l'on trouve chez de nombreuses plantes aquatiques (Pl. I et II ; A, B).

3. Si les faisceaux vasculaires sont presque identiques dans les trois échantillons, la zone de contact entre le parenchyme cortical et la stèle est nettement différente (Pl. I et II ; C).

4. La zone externe des coupes du rhizome fossile montre, sous l'épiderme, 5 à 6 assises de cellules sclérifiées, nettement plus petites que celles du parenchyme cortical. Chez *Narthecium* de telles cellules n'existent pas ; si les premières assises de parenchyme cortical sont sclérifiées, les cellules de ce parenchyme sont toutes de même taille (Pl. I et II ; B).

De plus, il paraît certain qu'un rapprochement très étroit peut être établi entre la structure anatomique du rhizome fossile et celle du rhizome du *Scheuzeria palustris* actuel.

En effet, elles ont en commun :

1. la zone externe du parenchyme cortical lacuneux, à petites cellules sclérifiées (Pl. II et III ; B).

2. un parenchyme cortical à lacunes aérifères très nombreuses (Pl. II et III ; A et B).

3. la zone de contact entre le parenchyme lacuneux et les éléments vasculaires (Pl. II et III ; C).

En résumé, ceci nous permet d'affirmer que les rhizomes retrouvés à l'état subfossile dans la couche de tourbe B, n'appartiennent pas à *Narthecium ossifragum*, mais plus probablement à *Scheuzeria palustris*.

II. *Analyses polliniques.*

Nous nous sommes interrogé sur le point de savoir si l'on retrouverait des pollens de *Scheuzeria palustris* dans l'assise de tourbe formée par les structures que nous venons de décrire (couche B), mais aussi, éventuellement, dans les couches A et C.

Un premier examen des pollens de la couche B nous a permis d'identifier celui de *Scheuzeria palustris* (fig. 1).

Nous avons alors entrepris le comptage et l'identification de tous les pollens et spores présents dans les trois couches afin :

1. d'avoir une idée du pourcentage du pollen de *Scheuzeria palustris* (par rapport aux pollens forestiers).

2. de pouvoir éventuellement situer les horizons étudiés dans les diagrammes polliniques déjà effectués sur le Haut Plateau.

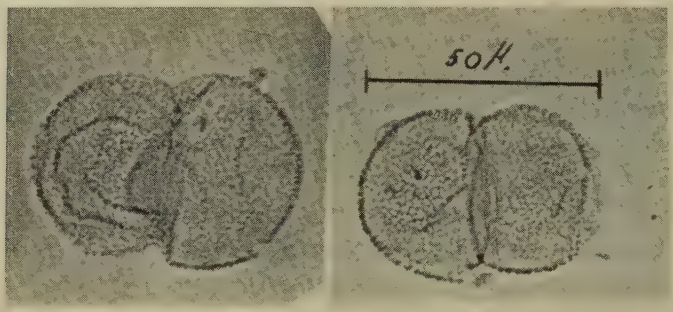


Fig. 1. — Grain de pollen de *Scheuzeria palustris* après acétolyse. (Niveau 2, couche B, tourbe à Scheuzeria palustris)

Méthode. — Les pollens sont préparés suivant la méthode d'acétolyse d'Erdtman (1952). Après le traitement, les pollens sont colorés à la fuchsine basique. Pour chaque échantillon, nous avons fait 3 ou 4 lames et sur chacune d'elles, nous avons compté au moins 250 pollens forestiers. Les résultats sont calculés en effectuant la moyenne des trois ou quatre comptages. Signalons en outre que les valeurs obtenues pour chacune des lames ne diffèrent pas sensiblement des valeurs moyennes.

Les résultats sont rassemblés dans le Tableau I. Plusieurs faits importants s'en dégagent :

I. — Dans la couche B, qui nous intéresse tout particulièrement, nous avons observé un grand nombre de pollens de *Scheuzeria palustris*, 122 pour 1304 pollens forestiers, soit 9 % par rapport à ceux-ci (Corylus inclus).

Dans les couches A et C, nous n'avons décelé aucun pollen de *Scheuzeria palustris*.

Dans aucune des couches A, B et C, nous n'avons observé de pollen de *Narthecium ossifragum*.

Cette analyse confirme donc les données que nous avons obtenues par l'étude des structures anatomiques des restes fossiles de la couche B. Ces restes végétaux doivent être attribués à *Scheuzeria palustris*.

II. — Les spectres obtenus pour les trois couches nous permettent de situer celles-ci dans la stratigraphie des tourbières établies par les nombreux diagrammes polliniques réalisés sur le Haut-Plateau. Les premiers furent établis par Erdtmann (1928) et par Bouil-

LENNE R. et M. (1937). Beaucoup d'autres profils ont été étudiés depuis, par SCHWICKERATH (1937), FLORSCHÜTZ et VAN OYE (1938), OVERBECK et SCHNEIDER (1938), FLORSCHÜTZ et VAN OYE (1939), FLORSCHÜTZ et VAN OYE (1946), PERSCH (1950), VAN DER HAMMEN (1953), SAUVAGE (1954) et DRICOT (1960).

En nous référant tout particulièrement au diagramme Ma IV de DRICOT (1960) réalisé dans la Fagne des Wéz, nous avons tenté de situer les niveaux que nous avons étudiés.

TABLEAU 1

	Couche A. tourbe à Betula		Couche B. tourbe à Narthecium ? (STREEL 1957)		Couche C. tourbe à Betula et Vaccinium	
Nombre de lames	4 lames		4 lames		3 lames	
Conifères	50	3,8 %	47	3,4 %	25	3 %
Corylus	499	38,2	411	30,6	229	28
Betula	366	28	94	6,9	80	9,8
Alnus	66	5	279	20,7	194	23,9
Tilia	49	3,7	80	5,9	65	8
Ulmus	88	6,7	123	8,1	46	5,1
Quercus	104	7,9	205	15,2	108	10,3
Fraxinus	39	2,9	39	2,9	22	2,6
Salix	0	0	9	—	15	1,4
Fagus	0	0	1	—	2	—
Varia	45	—	53	—	12	—
Quercetum mixtum	280	21,4	447	33,2	241	29
Pollens forestiers	1.304		1.343		810	
Ericaceae	9	—	19	1,4	141	17,4
Empetrum	0	0	8	—	79	9,8
Graminea	14	1	0	0	0	0
Cyperaceae	1	—	1	—	0	0
Scheuzeria palustris	0	0	122	9 %	0	0
Lycopodium	6	—	10	—	4	—
Dryopteris	11	—	6	—	4	—
Sphaignes	439	33,6	3.170	236	659	81,3

Couche A (Niveau 1) : tourbe parmi les bouleaux de la base de la tourbière.

Par ses caractéristiques palynologiques, ce niveau peut être situé dans le bas du profil Ma IV de Dricot. Seul le pourcentage de Betula est anormalement élevé ; remarquons cependant qu'il est le même que celui donné par Dricot à la base de son profil : 28 %. Mais, à ce niveau de Ma IV, aucun des pourcentages des autres pollens forestiers que nous avons obtenu, ne correspond.

On est donc en droit de penser que l'abondance de Betula à la base de cette partie de la tourbière de la Fagne Wallonne (flanc SW.) est simplement due au fait que la tourbière s'installe généralement dans un bois de Betula (cfr. Bricot 1960, p. 163). La chose est évidente à cet endroit de la tourbière puisqu'on y trouve des troncs entiers de Betula. L'abondance de ce pollen est donc un phénomène purement local : en effet, si à la base du profil de Dricot le bouleau atteint 28 %, dans tout le reste, il oscille entre 8 et 13 %.

En ne tenant pas compte de Betula, on pourrait placer au mieux ce premier niveau aux environs de la transition VII-VIII, où les pollens de Quercus, Ulmus, Tilia, du Quercetum mixtum, d'Alnus et de Pinus ont des valeurs correspondantes à celles du niveau 312 du profil Ma IV. On ne peut le situer ailleurs ; en effet :

— absence presque complète d'Ericales.

— absence de Fagus (IX, X et XI exclus) ;

— valeurs trop faibles d'Alnus et de Quercus (VIII exclu) ;

— valeurs trop faibles de Corylus et valeur trop forte de Tilia (VI et partie inférieure de VII exclus).

Si maintenant on attribuait au bouleau la valeur moyenne de 10 % trouvée par Dricot dans la zone de transition VII-VIII et si d'après cela on corrige (*) les pourcentages des autres pollens forestiers, on obtient des valeurs qui permettent de placer ce niveau presqu'exactement à la transition VII-VIII.

Couche B (Niveau 2) : tourbe à *Scheuzeria palustris*.

Les valeurs obtenues situent ce niveau entre les points 227 et

(*) A ce niveau nous avons compté 366 pollens de Betula, soit 28 % des pollens forestiers. Si la valeur du bouleau n'avait été que de 10 %, on aurait compté que 131 pollens de Betula. Le total des pollens forestiers aurait alors été de (1304-(366-131)) = 1069. D'après ce chiffre on calcule les nouveaux pourcentages des autres pollens forestiers.

277 cm. du diagramme Ma IV de Dricot. C'est la zone VIII a où Ulmus domine Tilia. Si l'on regarde MaIV, on voit en effet qu'en dessous de cette zone, Alnus et Quercus sont trop faibles par rapport aux valeurs que nous avons obtenues, tandis qu'au dessus le pourcentage d'Alnus est plus élevé et que Tilia domine Ulmus.

Couche C (Niveau 3) : tourbe à *Betula* et *Vaccinium*.

Ce niveau appartient à la zone VIII b, car on note :

— l'absence de Fagus, excluant IX, X, et XI.
— la dominance de Tilia sur Ulmus.
— les pourcentages proches de Corylus, Alnus et du Quercetum mixtum.

De plus les pourcentages de Quercus, des Ericales et d'Empetrum (*) sont autant d'indices qui autorisent à situer ce troisième niveau dans la partie inférieure de VIIIb.

Conclusions

Nous avons étudié les structures végétales conservées à l'état subfossile et les pollens de trois assises de tourbe situées à la base du flanc Sud de la tourbière de la Fagne Wallonne.

1. L'étude morphologique et anatomique des structures constituant une assise de tourbe décrite sous le nom de couche à *Narthecium ossifragum* par Streel en 1957, comparée à celle des plantes actuelles de *Narthecium ossifragum* et de *Scheuzeria palustris*, nous permet d'affirmer qu'elles n'appartiennent pas à *Narthecium ossifragum*, mais plus probablement à *Scheuzeria palustris*.

2. L'existence et le pourcentage élevé (9 %) du pollen de *Scheuzeria palustris* et l'abscence de celui de *Narthecium ossifragum* dans cette couche confirme entièrement cette première conclusion.

3. *Scheuzeria palustris* existe uniquement dans l'assise de tourbe qui surmonte la tourbe à bouleaux de la base du profil.

(*) En ce qui concerne la présence d'*Empetrum nigrum* en Ardenne, Dricot écrit (cfr. p. 166) qu'il ne se rencontre plus que dans le stade embruyéré du *Sphagnetum medio-rubelli*. Qu'il nous soit permis de rappeler que Bouillenne et al. (1931) et Streel (1959) ont montré qu'Empetrum était extrêmement abondant en Fagne de Cléfay et qu'il joue un rôle aujourd'hui un rôle important au sein du Vagineto-Sphagnetum recurvi, qui est une association hautement turfigène.

4. En comparant les résultats des analyses polliniques effectuées dans les trois assises de la base de la tourbière avec le diagramme Ma IV de Dricot (1960), nous avons établi que :

a. La partie Sud de la tourbière, en contrebas du sommet de Botrange, s'est installée au moment de la transition Boréal-Atlantique. Elle a commencé à s'édifier dans un bois de bouleaux ainsi que le prouvent les restes bien conservés de *Betula* et l'abondance de pollen de celui-ci.

b. La tourbe à *Scheuzeria palustris* s'est formée pendant la période Atlantique, sous période à Ulmus (VIIIa).

c. Enfin, la base de la troisième assise, riche en brindilles de *Betula* et de *Vaccinium* a pu être située au début de la seconde moitié de la période Atlantique sous-période à Tilia, VIIIb).

* * *

Dans son essai de prodrome des tourbières de la région Eurosibérienne, Duvigneaud (1948) range les associations à *Scheuzeria palustris* parmi les Erico-Sphagnetalia dans l'alliance Scheuzerio-Rhyncosporion.

C'est une « aliance circumboréale comportant principalement deux groupements » :

— le *Caricetum limosae-Scheuzerietum palustris* : association typiquement boréo-montagnarde des « Schlenken » et des « Laag » des tourbières à sphaignes, où domment diverses espèces de sphaines du groupe *Cuspidata*, avec cependant une variante à *Sphanum recurvum*.

— le *Rhyncosporeto- Sphagnetum* : groupement vicariant du premier, moins boréomontagnard, plus atlantique, où dominent *Rhyncospora alba* et *Sphagnum cuspidatum*.

Actuellement, en Belgique, la seconde association est, de loin, mieux représentée que la première, qui ne se trouve plus qu'à l'état relictuel ou très appauvrie en espèces (Duvigneaud et Vandenberghen, 1945 ; Vandenberghen, 1948 et 1952). Le groupement typique à *Scheuzeria palustris* comme caractéristique dominante ou co-dominante, tel qu'il est décrit par Cajander (1913), Melin (1917) et Osvald (1923) dans les tourbières scandinaves n'existe plus chez nous.

La littérature fournit quelques renseignements sur les tourbes à *Scheuzeria palustris*. Dans la tourbière de la Walle, Overbeck

(1949) a découvert une tourbe à *Scheuzeria* et *Sph. cuspidatum*, à 20-30 cm de la base de la tourbière, juste au-dessus du Grenzhorizon qui à cet endroit coïncide avec le début de la courbe de *Fagus*. Averdiek (1957) dans son étude des tourbières du Holstein a montré l'existence d'une alternance de couches de *Betula* et de tourbe à *Scheuzeria* ou à *Andromeda polyfolia* ; cette alternance correspondrait à une succession de périodes sèches et d'engorgement en eau sur la tourbière. Cet auteur trouve ce type de tourbe à différents niveaux (profils V 3, 157-158 cm. ; V 4, 61-119 cm.). Le pollen de *Scheuzeria* y atteint des valeurs variant entre 0.25 et 2 %. Mais, toutes ces tourbes à *Scheuzeria* se sont formées au cours des périodes Subboréale ou Subatlantique (périodes IX, X, XI).

Cependant, Overbeck (1952) décrit une couche de tourbe à *Scheuzeria*, *Sphagnum cuspidatum*, *Sphagnum médium* et *Sphagnum fuscum* dans les niveaux inférieurs des dépôts tourbeux du « Grosse Moor bei Gifhorn » (profils III, 220-250 cm, IV, 205-235 ; V, 240-255 ; VI, 275-285 ; VIII, 200-270). Cette assise est vraiment comparable à celle que nous venons de décrire en Fagne Wallonne :

— elle surmonte une assise de tourbe à *Betula* directement en contact avec l'argile ;

— elle est constituée presqu'uniquement de restes de *Scheuzeria* et de sphaignes.

— elle s'est formée pendant l'Atlantique, exactement entre le début de la période VIIIa et le début de VIIIb.

D'après Overbeck, l'édification de cette tourbe s'est faite pendant une phase particulièrement humide du début de la période Atlantique. Le développement d'un tel type de végétation correspondrait à l'installation d'un Hochmoor typique.

Nous signalerons encore qu'une tourbe d'apparence identique à celle de la Fagne Wallonne a été observée par Deuse, Ramaut et Streel (1957) à la tourbière de Weywertz près de Sourbrodt.

Or l'assise de tourbe à *Scheuzeria palustris* que nous venons de décrire au sein de la Fagne Wallone est fort étendue. Elle est visible sur plus de 500 m de long de la tranche d'exploitation. Il semble donc que le climat de la première moitié de la période Atlantique a été très humide. Simultanément au développement des sphaignes, *Scheuzeria* s'est fortement développée dans une zone où les plans d'eau libre, à écoulement lent, devaient être nombreux. L'eau qui s'écoulait du sommet de Botrange s'est vraisemblablement accu-

mulée dans le bois de bouleaux à sphaignes. L'association, une fois installée dans cette partie de la tourbière naissante, s'y est développée considérablement au point de former une assise de tourbe d'une épaisseur moyenne de 50 cm en moins de 2.000 ans.

En effet, des datages au C_{14} de branches de *Betula*, prélevées dans les couches A et C qui limitent la couche B à *Scheuzeria*, apportent une précision d'ordre chronologique intéressante.

La couche A a été analysée par deux laboratoires différents. Un premier échantillon prélevé par Bouillenne (1960) a été daté de 6740 $\pm$ 70 ans à Groeningen (Pays-Bas). Un second échantillon prélevé par Bouillenne et Duchesne en 1960 au même niveau fut daté de 6720 $\pm$ 120 ans à Bâle (Suisse). La concordance entre ces deux résultats est remarquable.

La couche C, datée également en Suisse, a donné le chiffre de 4690 $\pm$ 100 ans (*).

Mais aussi brusquement qu'elle s'est installée, cette formation à *Scheuzeria* disparaît au début de la seconde moitié de la période Atlantique (VIIIb). Cette assise de tourbe est, en effet, surmontée d'une tourbe riche en débris de bouleaux et d'Ericacées qui à certains endroits forment un lit compact de brindilles. Les bouleaux n'ont cependant jamais atteint la taille de ceux qui permirent l'installation de la tourbière et, nous avons dit précédemment, que dans cette tourbe on ne trouvait plus ni structures conservées, ni pollen de *Scheuzeria*.

Il est probable que l'arrêt du développement de l'association à *Scheuzeria palustris* est le résultat de la disparition des plans d'eau libre en surface, due à l'accumulation de la tourbe sur la pente ou peut-être à l'apparition d'une période moins humide au début de la seconde moitié de l'Atlantique.

D'autre part, nous savons que les associations à *Scheuzeria palustris* ont à l'heure actuelle un caractère boréo-montagnard accusé ; d'ailleurs les tourbes formées par ces associations se retrouvent surtout dans les tourbières situées en dehors des régions atlantiques. Étant donné qu'aujourd'hui sur les Hautes-Fagnes et particulièrement sur la Fagne Wallonne, la végétation de biotopes semblables est celle du *Rhyncosporeto-Sphagnetum*, nous pensons que l'existence d'une tourbe à *Scheuzeria palustris* dans les dépôts

(*) Les deux datages effectués en Suisse ont pu être réalisés grâce au Professeur J. Duchesne. Les résultats ont été publiés par J. Duchesne et J. Depireux (1961) Geochim et Cosmochim. Acta.

tourbeux sous-jacents, semble indiquer qu'au début de la période Atlantique cette tourbière avait, en plus de son caractère océanique indéniable, un caractère boréal nettement plus accusé qu'aujourd'hui.

Nous remercions Monsieur le Professeur Bouillenne et M. Streel pour l'aide qu'ils nous ont apportée au cours de ce travail.

UNIVERSITÉ DE LIÈGE.
Institut de Botanique
Station Scientifique des Hautes Fagnes.

BIBLIOGRAPHIE

AVERDIECK (1957), Zur Geschichte der Moore und Wälder Holstein. *Nova Acta Leopoldina*, neue Folge, 130, Bd. 19.

BOUILLENNE R. et M. et PREVOT P. (1931), Une association végétale à « Empretum » dans les Fagnes de Clefay. *Bul. Ac. Roy. de Belgique* ; Cl. Sc., 5me série, t. 17, nº 4.

BOUILLENNE R. (1933), Les eaux des tourbières du plateau de la Baraque-Michel. *Ann. Soc. Géol. Belg.* LVII, 5.

BOUILLENNE R. et M. et coll. (1937), Les viviers du plateau de la Baraque Michel. *Soc. Roy. Sc. Liège*, bull. 12.

BOUILLENNE R. (1960), Les Hautes-Fagnes. *Rev. Les Hautes Fagnes*, nº 4.

CAJANDER (1913), *Acta Foresta Fenni*, 2.

DEUSE, P., RAMAUT J. et STREEL M. (1957), Étude phytosociologique et biochimique de la tourbière de Weywertz. *Bull. Soc. SC. Liège*, 5 et 6.

DRICOT E. M. (1960), Recherches palynologiques sur le Plateau des Hautes-Fagnes. *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.*, t. 92.

DUCHESNE J. et DEPIREUX J. (1961). *Geochim. et Cosmochim. Acta.*

DUVIGNEAUD P. et VANDENBERGHEN C. (1945) Associations tourbeuses en Campine Occidentale. *Biol. Jaarb.* 1945.

DUVIGNEAUD P. (1949). Classification phytosociologique des tourbières de l'Europe. *Bull. Soc. Bot. Belg.*, t. 81.

ERDTMAN G. (1928), Études sur l'histoire post-arctique des forêts de l'Europe du nord-ouest. — III. Recherches dans la Belgique et le Nord de la France. *Gest. För. Föhr.* Stockholm, 50.

ERDTMAN G. (1954), An introduction to pollen analysis. *Chron. Bot. Comp.* Woltham, Massachusset.

FLORSCHÜTZ F. et VAN OYE E. L. (1948), Sur la détermination de l'âge des viviers du plateau de la Haute Fagne belge. *Tijdschr. Kon. Aardrijksk. Genoot.* ; Deel LV, 3.

FLORSCHÜTZ F. et VAN OYE E. L. (1939), Recherches analytiques de pollens dans la région des Hautes Fagnes Belges. *Biolog. Jaarb.* Dodonaea 1939.

FLORSCHÜTZ F. et VAN OYE E. L. (1946), Recherches palynologiques dans la région des Hautes Fagnes Belges. *Biolog. Jaarb.* Dodonaea 1946.

Melin (1917), Studier över Norrlandska Myrmarkernas Vegetation. Upsala 1917.

Osvald H. (1923), Die Vegetation der Hachmoor Komosse. *Svenska Växtsociologica Sällskapets*. Handlingar I. Upsala.

Osvald H. (1925), Die Hochmoortypen Europas. *Svenska Växtsociologica Sällskapets*. Upsala.

Overbeck F. et Schneider S. (1938). Mooruntersuchungen bei Lüneburg und bei Bremen und die Reliktnatur von Betula nana L. in NW.-Deutschland. *Zeitschr. f. Bot.*, 33.

Overbeck F. (1949), Neue pollenanalytische-stratigraphischen Untersuchungen zum Pflug von der Walle. *Nachrichten aus Niedersachsens Urgeschichte*.

Overbeck F. (1952), Das grosse Moor bei Gifhorn im Wechsel hygrokliner und xerokliner Phasen der nordwestdeutschen Hochmoorentwicklung. *Niedersächsigen Amt Landesplanung und Statistik*.

Persch F. (1950), Zur postglaziale Wald und Moorenentwicklung im Hohen Venn. *Decheniana*, Bd. 104, Bonn.

Sauvage J. (1954), Palynologie et pétrographie des tourbes de la cuvette parisienne et des Ardennes. *Mém. Serv. Cart. Géol.* Alsace Lorraine, Strasbourg, nº 12.

Schwickerath M. (1937), Die nachzeitliche Waldgeschichte der Hohen Venn und ihre Beziehung zur heutigen Vennvegetation. *Geologischen Landanstalt*, Neue Folge, Hft. 184.

Streel M. (1957), Note sur l'existence d'une tourbe à Narthecium ossifragum dans les couches anciennes d'une tourbière du plateau des Hautes Fagnes. *Bull. Soc. SC*, Liège, nº 4.

Streel M. (1959), Étude phytosociologique de la Fagne Wallonne et de la Fagne de Cléfay. *Acad. R. Belg.* (*Cl. Sciences*). Mémoires, t. XXXI, fasc. I.

Vandenberghen C. (1948), La tourbière de Postel. *Biolog. Jaarb.* 1948.

Vandenberghen C. (1952), Contribution à l'étude des bas-marais de Belgique. *Bull. Jard. Bot. État*, Bruxelles, t. 22.

Van der Hammen (1953), Late-glacial and periglacial phenomena in the Netherlands. *Leidse Geol. Meded.* 17.

SUMMARY

According to Streel (1957) a peat constitued for a great part by rests of *Narthecium ossifragum* exist in the lower part of the bog « Fagne wallonne » near Botrange (Belgium). Comparison of morphological and anatomical structure of the fossil rhizoms with those of the actual *Narthecium ossifragum* and *Scheuzeria palustris* lead to the conclusion that these fossil rests belong to *Scheuzeria palustria*. High percentage of Scheuzeria-pollen at this level (9 %) and absence of Narthecium pollen confirm this conclusion. Pollen analysis and C_{14} data indicate that the Scheuzeria peat appears at the beginning of the period VIII a and disappears about 1500 years later.

Bull. Soc. Royale Sciences Liège, 30e année, nº 7-8 1961, pp. 334-339

LES CORDYCEPS DU CONGO

par J. MOUREAU
Docteur en Botanique
Maître de Conférences à l'Université de Liège

Cette note est le résumé succinct d'une étude descriptive des ascomycètes parasites d'insectes récoltés dans diverses régions du Congo au cours de ces vingt dernières années.

Nous avons publié en 1949, un premier mémoire dans lequel nous précisions notre conception du genre **Cordyceps** Fr., conception selon laquelle ce genre groupe toutes les formes d'**hypocréacées** entomophytes à spores hyalines multiseptées, en écartant les formes parasites de champignons hypogés que nous rangeons dans le genre **Cordylia** Tul.

Ainsi conçu le genre **Cordyceps** Fr. se subdivise en trois sous-genres : **Torrubiella** Boudier, **Eucordyceps** Lindau et **Ophiocordyceps** Petch.

Le sous-genre **Torrubiella** Boudier rassemble les espèces qui ne possèdent pas de stroma différencié, dont les périthèces naissent directement d'un mycelium superficiel, membraneux ou byssoïde, dont les asques, nettement capités, sont parfois tétrasporés au lieu d'être octosporés, qui possèdent ou ne possèdent pas de paraphyses, et dont les spores très longues et multiseptées se scindent dès leur libération en articles monocellulaires.

Le sous-genre **Eucordyceps** Lindau groupe toutes les espèces dont les spores très longues et multiseptées se scindent aussi, dès leur libération, en articles monocellulaires, mais possèdent en outre un ou plusieurs stroma érigés, plus ou moins nettement différenciés sur lesquels se développent les périthèces, ainsi que des asques très longs, cylindriques et nettement capités. Chez certaines espèces les périthèces sont superficiels dès le début de leur développement et se forment sur un stroma érigé, pulviné, filiforme ou cylindrique,

Manuscrit reçu le 16 mars 1961.

de structure simple, constitué d'hyphes parallèles analogues ou peu différentes de celles du mycelium superficiel ou du sclérote. Chez d'autres, les périthèces naissent au sein d'un tissu superficiel distinct, mais s'en dégagent complètement ou partiellement dès qu'ils atteignent leur maturité. Chez d'autres espèces encore, les périthèces ne se forment que sur une portion nettement définie du stroma, le capitule, distincte du stipe non seulement par sa forme et ses dimensions mais aussi par sa structure. Les périthèces sont alors semi-immergés ou totalement enfouis, même à maturité complète, dans les tissus de ce capitule, tissus qui peuvent être diversement différenciés et sont parfois protégés par une cuticule à structure particulière. Les paraphyses n'existent généralement pas sauf chez quelques espèces à périthèces superficiels sur un stroma peu différencié.

Le sous-genre **Ophiocordyceps** Petch comprend les espèces dont les spores multiseptées, plus ou moins fusiformes et nettement plus courtes que l'asque, ne se scindent pas, à maturité, en segments monocellulaires. Les périthèces se forment sur un stroma érigé bien différencié. Les asques sont généralement en forme de massue allongée et ne sont pas distinctement capités.

Ainsi classées, les diverses espèces entomophytes du genre **Cordyceps** Fr. forment une série évolutive continue dont le thème est la complication progressive de la structure de l'ascocarpe et la protection de plus en plus efficace des organes de reproduction et de propagation.

C'est dans cet ordre qu'ont été classées les vingt-quatre espèces que nous décrivions dans notre premier mémoire : une espèce du sous-genre **Torrubiella** Boud. et vingt-trois espèces de **Eucordyceps** Lindau. Toutes ces espèces étaient nouvelles pour la flore congolaise et dix d'entre-elles nouvelles pour la Science. Une aquarelle de chacune de ces espèces y a été reproduite en couleur.

Un second mémoire intitulé « Nouveaux Cordyceps du Congo » va paraître incessamment dans la collection de la revue « Lejeunia ».

C'est notre seconde contribution à l'étude des **Cordyceps** de la Flore Congolaise. Nous y décrivons en détail douze espèces dont trois sont des espèces nouvelles pour la Science. Nous signalons en outre la présence au Congo de trois autres espèces que nous y avons récoltées et identifiées mais dont nous n'avons pas pu faire une étude détaillée. Ce mémoire sera, lui aussi, accompagné de planches

en couleur reproduisant des aquarelles de chacune de ces douze espèces.

Enfin nous corrigeons une erreur de dénomination qui s'était glissée dans notre premier mémoire. Le nom que nous y avions donné à une espèce nouvelle, **C. (Eucordyceps) furcata** Moureau, doit être rejeté car il a été créé en 1923 par MacLennan et Cookson pour désigner une espèce différente de la nôtre. Nous proposons de remplacer cette dénomination **C. (Euc.) furcata** Moureau, **nomen rejiciendum** (9) par la combinaison nouvelle suivante **C. (Euc.) gemella** Moureau **comb. nov.**

Actuellement la flore congolaise compte trente-neuf espèces entomophytes appartenant au genre **Cordyceps** Fr. L'inventaire est cependant loin d'être terminé.

Voici la liste des espèces qui ont été décrites ou identifiées au Congo.

Sous-genre **Torrubiella** Boud.

1. **C. (Tor.) carnata** Moureau (9) sur fourmi **(Ponerinae).**
2. **C. (Tor.) arachnophila** Johnston var. **pulchra** Mains. (5) sur ponte d'araignée.

Sous-genre **Eucordyceps** Lindau.

3. **C. (Euc.) tuberculata** (Lebert) Maire (Petch **13**) sur imago de sphingide (Lépidoptère)
4. **C. (Euc.) filiformis** Moureau (9) sur chenille (Lépidoptère)
5. **C. (Euc.) crinalis** Ellis et Everhart (Lloyd **4**) sur chrysalides (Lépidoptères)
6. **C. (Euc.) deflectens** Penzig et Saccardo (**10**) sur pupes de Coléoptère ou d'Orthoptère.
7. **C. (Euc.) engleriana** P. Hennings (Petch **16**) sur une araignée **(Sparassidae)**
8. **C. (Euc.) falcata** Berkeley (Petch **11**) sur larve de Coléoptère (Lamellicorne)

9. **C. (Euc.) corallomyces** Möller (8)
sur larve de Coléoptère (Lamellicorne)

10. **C. (Euc.) taylori** (Berk.) Saccardo (19)
sur chrysalide (Lépidoptère)

11. **C. (Euc.) truncata** Moureau (9)
sur larve de Coléoptère **(Elateridae)**

12. **C. (Euc.) variabilis** Petch (17) non Mains (6)
sur larve de Coléoptère (Lamellicorne)

13. **C. (Euc.) aurea** Moureau (9)
sur chrysalide (Lépidoptère)

14. **C. (Euc.) typhulaeformis** Berk. et Cooke (Petch **14**)
sur chrysalide (Lépidoptère)

15. **C. (Euc.) takaomontana** Yakusiji et Kumazawa (Kobayasi **3**)
sur larve de Coléoptère.

16. **C. (Euc.) gemella** Moureau **comb. nov.**
sur larve de Coléoptère (Lamellicorne)

17. **C. (Euc.) rubripunctata** Moureau (9)
sur larve de Coléoptère **(Elateridae)**

18. **C. (Euc.) coccinea** Penzig et Saccardo (**10**)
sur pupe de Coléoptère.

19. **C. (Euc.) variegata** Moureau (9)
sur chenille (Lépidoptère).

20. **C. (Euc.) miniata** Moureau sp. nov.
sur chrysalide (Lépidoptère)

21. **C. (Euc.) cinnabarina** Petch (**15**)
sur chenille (Lépidoptère)

22. **C. (Euc.) militaris** Linné ex Fries et sa var. **sphaerocephala** Kunz et Schm. (Petch **14**)
sur chenille (Lépidoptère)

23. **C. (Euc.) pseudo-insignis** Moureau (9)
sur imago de Coléoptère **(Melolonthinae)**

24. **C. (Euc.) pruinosa** Petch (**11**)
sur chrysalide (Lépidoptère)

25. **C. (Euc.) vinosa** Moureau **sp. nov.**
sur chenille (Lépidoptère)

26. **C. (Euc.) uleana** P. Hennings (**2**)
sur oothèque de **Mantidae** (Orthoptère)

27. **C. (Euc.) velutipes** Massee (**7**)
sur larves de Coléoptères (Melolonthine et Lamellicorne)

28. **C. (Euc.) obtusa** Penzig et Saccardo (**10**)
sur nymphe de cigale (Homoptère)

29. **C. (Euc.) heteropoda** Kobayasi (**3**)
sur nymphe de cigale (Homoptère)

30. **C. (Euc.) lutea** Moureau (**9**)
sur imago d'Hémiptères (Jassides et Fulgorides)

31. **C. (Euc.) dipterigena** Berk. et Br. (Massee **7**)
sur mouches (Diptère)

32. **C. (Euc.) sphecocephala** (Klotzsch) Berk. et Curt. (Petch **14**)
sur abeille, guêpe, bourdon, ichneumon, pélopée et **Belanogaster** (Hyménoptères)

33. **C. (Euc.) irangiensis** Moureau **sp. nov.**
sur fourmi **(Camponotinae)** Hyménoptère.

34. **C. (Euc.) bicephala** Berk. (Moureau **9**)
sur fourmi **(Paltothyreus tarsatus) Ponerinae.**

35. **C. (Euc.) bicephala** subsp. **nutans** (Pat.) Moureau (**9**)
sur imago d'Hémiptères **(Reduvidae** et **Pentatomidae)**

36. **C. (Euc.) bicephala** subsp. **curculionum** (Tul.) Moureau (**9**)
sur imago de Coléoptère **(Curculionidae)**

37. **C. (Euc.) lilacina** Moureau (**9**)
sur sauterelle (Orthoptère)

38. **C. (Euc.) larvicola** Quélet (**18**)
sur larve de Coléoptère (Lamellicorne)

Sous-genre **Ophiocordyceps** Petch.

39. **C. (Oph.) unilateralis** (Tul.) Petch (12)
sur fourmi (Hyménoptère)

Université de Liège
Institut de Botanique
Dir. R. Bouillenne, le 10 mars 1961.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Hendrickx F., Sylloge Fungorum Congensium. *Publ. INEAC.* Sér. Scient., n° 35, 1948.

(2) Hennings P., Fungi Amazonici II. *Hedwigia* 36, p. 190, 1897.

(3) Kobayasi Y., The Genus Cordyceps and its allies. *Sci. Rep. Tokyo Bunrika Daigaku.* Sect. B. n° 84, 5, p. 53, 1941.

(4) Lloyd C. G., Additional notes on Cordyceps. *Mycol. Writings,* n° 6, p. 911, 1920.

(5) Mains E. B., The Genus Gibellula on spiders in North America. *Mycologia* 42/2, p. 306, 1950.

(6) Mains E. B., North American Entomogenous Species of Cordyceps. *Mycologia* 50/2, p. 169, 1958.

(7) Massee, Revision of the Genus Cordyceps. *Annals of Bot.* 9, p. 33, 1895.

(8) Möller, Phycomyceten und Ascomyceten aus Brasilien. *Edit. Fischer Iena,* 1911.

(9) Moureau J., Cordyceps du Congo Belge. *Inst. Nat. Col. Belg. Mémoire* in-4° 7/5, 1949.

(10) Penzig et Saccardo, Icones Selectae Fungorum Javanicorum, 1904.

(11) Petch T., Some Ceylon Cordyceps. *Trans. Brit. Myc. Soc.* 10/1-2, p. 28, 1924.

(12) Petch T., Notes on entomogenous Fungi. *Trans. Brit. Myc. Soc.* 16/1, p. 55, 1931.

(13) Petch T., Notes entomogenous Fungi. *Trans. Brit. Myc. Soc.* 16, p. 209, 1932.

(14) Petch T., Notes on entomogenous Fungi. *Trans. Brit. Myc. Soc.* 18/1, 1933.

(15) Petch T., Entomogenous Fungi from Madagascar. *Ann. Cryptog. Exot.* 6, p. 230, 1933.

(16) Petch T., Notes on entomogenous Fungi. *Trans. Brit. Myc. Soc.* 19/3, 1935.

(17) Petch T., Notes on entomogenous Fungi. *Trans. Brit. Myc. Soc.* 21 p. 37, 1937.

(18) Quélet L., Champignons du Jura et des Vosges, 6me suppl. *Bull. Soc. Bot. France* 25, 1878.

(19) Saccardo, Sylloge Fungorum 2, 1883 et suppl./9, 1891.

IMPRIMERIE GEORGE MICHIELS, S. A., 6 RUE DE LA PAIX, LIÈGE
PRINTED IN BELGIUM

NOUVEAUX *CORDYCEPS* DU CONGO

LEJEUNIA
REVUE DE BOTANIQUE

Mémoire n° 15 **Septembre 1961**

NOUVEAUX *CORDYCEPS* DU CONGO

par

Jules MOUREAU
Docteur en Botanique
Maître de Conférences à l'Université de Liège

Publié avec le concours du Gouvernement

LES PRESSES DE LEJEUNIA LIÈGE

INTRODUCTION

Ce mémoire constitue notre seconde contribution à l'étude descriptive des espèces entomophytes du genre *Cordyceps* recueillies au Congo.

Dans notre premier mémoire (**26**), publié en 1949, nous avions défini un système de classification des espèces au sein du genre **Cordyceps.**

Ce système subdivise le genre *Cordyceps* en trois sous-genres dont voici, résumées, les caractéristiques essentielles :

1) S.g. **Torrubiella** Boud. (**26**), dont les périthèces sont superficiels et libres, dispersés ou plus ou moins groupés sur un mycélium superficiel ou sur des stromas indifférenciés et dont les spores multiseptées se scindent aisément en segments monocellulaires dès leur libération. Eventuellement, présence de paraphyses.

2) S.g. **Eucordyceps** Lindau (**26**), dont les périthèces sont superficiels sur un stroma nettement différencié ou encore semi-immergés ou totalement immergés dans les tissus de ce stroma, dont les spores multiseptées se scindent en segments monocellulaires dès leur libération.

3) S.g. **Ophiocordyceps** Petch. (**26**), dont les périthèces se forment sur des stromas bien différenciés, sont libres, semi-immergés ou totalement immergés et dont les spores multiseptées plus ou moins fusiformes ne se scindent pas en segments monocellulaires au moment de leur libération.

C'est ce système de classification que nous appliquerons dans la présentation de ce second mémoire bien que, à la lumière de l'expérience acquise, il nous paraisse maintenant trop élémentaire et incomplet.

Il sera profondément remanié et constituera, avec la synthèse des connaissances que nous avons acquises au cours de cette longue étude, la matière d'une révision du genre *Cordyceps* au Congo.

Avant d'aborder la description de douze espèces nouvelles pour le Congo, objet essentiel de ce mémoire, nous désirons rectifier une erreur que nous avons commise en 1949 (**26**) au sujet de la dénomination d'une espèce nouvelle : *C. (Eucordyceps) furcata* J. Moureau.

Ce nom doit être rejeté car il a été créé par Mclennan et Cookson (8) en 1923, pour désigner une espèce à clavule ramifiée, à capitule intercalaire mais à périthèces immergés, très nettement différente de celle que nous avons décrite.

C. (Euc.) furcata Moureau devient donc un « nomen rejiciendum » et nous proposons à sa place la dénomination *C. (Euc.) gemella* nom. nov.

Nous reprenons ci-dessous, sous ce nouveau nom, la diagnose que nous avons publiée en 1949.

Cordyceps (Eucordyceps) gemella Moureau

Syn. *C. (Euc.) furcata* Moureau nom. rejic. (26)

Clavulae duae, dichotomico-furcatae, 10-15 mm altae, e cervice aut ano coleopteri larvae oriuntur.

Stipite robusto, cylindrico, aequale, rigido, basi ramis aequalibus dichotomo et rufo-brunneo sed sursum pallidiore, laeve vel leniter tomentoso, 5-8 mm alto, 1-1,5 mm crasso, sursum in capitulo cylindrico incrassato sed apice sterile subacuto projecto.

Capitulo cylindrato, albo-brunneo, flavo-griseo, cinereopunctato, péritheciis prominulis echinato, 3-5 mm alto, 1-5 mm crasso, apice sterile acuto et albo 1,5-2 mm alto et 0,5 mm. crasso.

Peritheciis caespitosis, aggregatis sed etiam in stipite solitariis, primo immersis dein prominulis et tomentosis, externe albo-brunneis, intus brunneis, ostiolo nudo griseo-brunneo, ovatis obtusis, 450 (390-560) micr. altis et 290 (250-370) micr. crassis.

Ascis cylindratis, flexuosis, capitatis, basi breviter attenuatis, 370 (330-530) micr. longis et 8-10 micr. crassis.

Sporidiis filiformibus, hyalinis, multiseptatis, 290-500 micr. longis, 1,75-2,5 micr. crassis, mox in articulos bacillares rotundatos, 6,5 — 9 micr. longos secedentibus.

DESCRIPTION DES ESPECES NOUVELLES

1. Cordyceps (Torrubiella) arachnophila Johnston var. pulchra Mains (22)

Planches 1 et 4, fig. 1.

Un exemplaire de cette espèce a été récolté en forêt guinéenne, à Yangambi (alt. 450 m) en 1947, sur la ponte d'une araignée. Les œufs parasités étaient enfermés dans leur enveloppe soyeuse fixée à la face inférieure d'une feuille.

Il n'existait pas de mycélium externe.

L'hôte porte trois stromas trapus, subcylindriques ou obconiques, blancs, d'aspect floconneux, formés d'hyphes hyalines lâchement enchevêtrées. Ces stromas mesurent 2 à 4 mm de hauteur sur 1 à 1,5 mm de section. Leur sommet, légèrement épaissi et arrondi, simule une sorte de capitule pulviné, terminal, constitué par un tissu floconneux lâche et blanc, au sein duquel se forment les périthèces.

Les périthèces sont cespiteux, peu nombreux mais de grande taille. Ils sont d'abord immergés dans le tissu floconneux du stroma mais leur sommet en fait progressivement saillie de sorte que, à maturité complète, ils sont dégagés et libres sur plus de la moitié de leur hauteur. Ils sont blancs ou jaunâtres, translucides, et ont la forme d'une poire ou d'une massue ventrue. Leur col est assez long et insensiblement rétréci. Ils mesurent 1000 à 1200 μ de haut sur 450 à 500 μ de diamètre maximum. Leur paroi est mince, parfois légèrement épaissie au niveau de l'ostiole. En séchant, les stromas deviennent jaunâtres et les périthèces ambrés avec un sommet légèrement plus foncé.

Les asques sont cylindriques, flexueux, coiffés d'un capuchon hyalin, globuleux et souvent légèrement étranglés sous ce capuchon. Ils s'amincissent vers la base en un pédicelle grêle de longueur variable. Ils contiennent huit spores et mesurent 700 à 800 μ de long sur 6 à 8 μ de diamètre. Il n'existe pas de paraphyses.

Les spores sont filiformes, hyalines, de 50 à 60 μ plus courtes que l'asque dont elles sortent. Elles sont multiseptées et se scindent aisé-

ment, à maturité, en segments bacillaires à extrémités tronquées, mesurant 12 à 18 μ de long sur 1,5 à 2 μ d'épaisseur.

C. (T.) arachnophila Johnston avait, jusqu'à présent toujours été signalé sur cadavre d'araignée.

Mains (22) et Petch (31) soulignent à son sujet l'existence d'un mycélium superficiel blanc jaunâtre ou jaune, enrobant le cadavre de l'hôte. Ces auteurs précisent que les périthèces possèdent une teinte jaune brunâtre ou brun rougeâtre pâle.

Notre spécimen, décrit à l'état frais, pousse sur une ponte d'araignée et ne possède pas de mycélium externe. Cependant, sous l'enveloppe soyeuse de la ponte, les œufs sont enrobés dans un mycélium floconneux blanc jaunâtre dont la teinte passe au jaune sale quand le spécimen se dessèche.

Si l'on tient compte du fait que les descriptions de Mains et de Petch ont probablement été faites d'après des spécimens d'herbier, on peut admettre que notre exemplaire est, à ce point de vue, identique aux leurs.

Mains (22) considère que l'espèce décrite par Petch (31) sous le nom de *C. (T.) gibellulae* n'est autre que *T. arachnophila* Johnston. Ce même auteur rejette la dénomination *T. arachnophila* donnée par Thaxter parce que cet auteur n'a pas fourni de diagnose latine ni de description détaillée.

C. (T.) arachnophila Johnston (22) est très variable au point de vue de la taille des périthèces, des asques, des spores et des segments de spore. Mains y distingue plusieurs variétés dont la variété *pulchra* à laquelle appartient les spécimens que nous venons de décrire.

C. (T.) arachnophila est aussi très variable au point de vue de la morphologie du stroma. La présence de stromas dressés n'est pas un caractère constant. Les périthèces peuvent se développer directement sur le mycélium superficiel qui enrobe généralement l'hôte.

La synonymie de *C. (T.) arachnophila* Johnston s'établit donc comme suit :

Cordyceps arachnophila Johnston (Mains 22)
Torrubiella gigellulae Petch (31).

2. Cordyceps (Eucordyceps) crinalis Ellis et Everhart (3)

Planches 1 et 2, fig. 2.

Nous avons souvent récolté de très nombreux exemplaires de cette espèce en forêt guinéenne tropophylle, à Bambesa (Uele, alt. 650 m) en forêt-galerie à Gandajika (Kasaï, alt. 800 m), en forêt guinéenne ombrophile, à Yangambi (alt. 450 m) et en forêt équatoriale humide à Mabali (Lac Tumba, alt. 330 m).

Cette espèce pousse sur le cadavre d'une chenille grégaire enfermée dans son cocon ou sur sa chrysalide. En général l'hôte est mort peu de temps après avoir tissé son cocon et avant de s'être transformé en chrysalide. La chenille est repliée sur elle-même dans son enveloppe soyeuse de sorte que le cocon paraît biloculaire.

L'hôte porte une ou plusieurs clavules qui peuvent atteindre 18 à 20 centimètres de hauteur sur 0,5 à 1 mm de section. Leur hauteur moyenne est cependant de 60 à 80 mm.

La clavule est cylindrique, filiforme, assez rigide mais tortueuse, ramifiée dichotomiquement à deux, trois et même quatre niveaux différents. Ces ramifications s'amincissent en un sommet effilé, flexueux et souvent recourbé. Leur tissu interne est blanc. Leur revêtement externe est coloré, lisse et luisant. Il est gris brunâtre presque noir à la base de la clavule. Cette teinte pâlit insensiblement vers le haut et passe au gris cendré au niveau des premières ramifications et sur la base de ces dernières. Elle devient gris jaunâtre sur la majeure partie des ramifications qui sont en outre couvertes d'une pruine blanche plus ou moins persistante surtout au sommet. En séchant, la surface de la clavule se ride longitudinalement et devient mate sans cependant perdre sa teinte. Les spécimens conservés en alcool sont uniformément plus pâles.

La zone fertile de la clavule n'est pas nettement définie mais se limite généralement à la portion pruineuse des ramifications. C'est sous cette pruine que se forment les périthèces. Ceux-ci sont très nombreux, cespiteux et assez serrés les uns contre les autres, ce qui donne aux zones fertiles un aspect hérissé, scabre, grenu et noirâtre.

Les périthèces sont entièrement superficiels et libres dès le début de leur développement. Ceux qui sont isolés paraissent parfois portés par un pédicelle discoïde résultant, semble-t-il, de la prolifération du revêtement superficiel du stroma. Leur maturation est acropète. A maturité complète ils sont gris noirâtres, ovoïdes à sommet obtus et mesurent 350 à 550 μ de haut sur 250 à 400 μ de diamètre maximum. Ils possèdent une paroi lisse et luisante, très résistante, faite de larges

cellules hexagonales de 9 à 18 sur 7 à 15 μ dont les membranes épaisses sont colorées en brun jaunâtre.

Les asques, octosporés, sont hyalins, très réfringents quand on les observe dans l'eau, cylindriques ou plus ou moins claviformes et coiffés d'un capuchon hyalin, globuleux, très distinct. Ils sont atténués vers la base en un pédicelle grêle de 20 à 30 μ de long. Ils mesurent 200 à 250 μ de long sur 8 à 10 μ d'épaisseur.

Les spores sont filiformes et multiseptées. Elles sont flexueuses et forment un faisceau légèrement tordu sur lui-même. Elles mesurent 150 à 200 μ de long sur 1 à 1,5 μ d'épaisseur. Elles se scindent aisément quoique tardivement en segments bacillaires à extrémités tronquées, de 10 à 18 μ de long.

C. crinalis fut décrit pour la première fois par Ellis et Everhart en 1892 (3). Dans la suite Ellis le considéra comme synonyme de *C. sphingum* (Tul.) Sacc. Plus tard Lloyd (11) estima que cette synonymie n'était pas admissible et rétablit la dénomination initiale. Effectivement il n'est pas possible de confondre l'espèce que nous venons de décrire avec *C. sphingum* qui est d'ailleurs un synonyme de *C. tuberculata* (Leb.) Maire (26), ne possède pas de stroma différencié et dont la paroi des périthèces n'est pas pseudo-parenchymateuse. Petch (35) décrivit en 1937, sous le nom de *C. ramosa*, une espèce qui possède des caractères identiques à ceux de *C. crinalis* mais s'en distingue par la nature de l'hôte, un coléoptère, par la présence d'un mycélium superficiel et par le fait que les septa des spores sont espacés de 6 à 7 μ. Nous estimons que la création d'une espèce nouvelle sur de telles bases ne peut se justifier. La nature de l'hôte et l'existence d'un mycélium externe ne sont pas des caractères constants au sein d'une même espèce. Quant à la longueur des segments de spore (que Petch a d'ailleurs mesurée sur des spores encore enfermées dans l'asque et, par conséquent immatures), c'est un caractère extrêmement variable chez tous les *Cordyceps* et plus spécialement chez les formes à périthèces libres. *C. ramosa* Petch doit donc être considéré comme un synonyme de *C. crinalis* Ellis et Everhart.

Nos spécimens sont généralement d'une taille très supérieure à celle qu'attribuent Ellis (3), Petch (35) et Mains (23) à *C. crinalis* Ellis et Everhart. Ni Ellis ni Petch ni Mains ne semblent avoir observé des segments de spore libres. Petch mesure l'espacement entre les septa de la spore dans l'asque. Ellis, Lloyd et Mains décrivent les spores comme étant « obscurely multiseptate ». Nos spécimens, récoltés à maturité complète, libéraient des spores nettement multiseptées qui se

scindaient, après leur libération dans l'eau, en articles monocellulaires de 10 à 18 μ de long. Il n'est donc pas possible de confondre cette espèce avec *C. acicularis* Rav. (32, 23) qui lui ressemble par certains caractères mais est, selon Petch, un *Ophiocordyceps*.

Massee (24) décrivit une espèce voisine de *C. crinalis* Ellis et Everhart, sous le nom de *C. Henleyae* Massee. Cette espèce diffère cependant de *C. crinalis* par ses dimensions beaucoup plus grandes, par la forme de ses périthèces et par la taille considérablement plus petite de ses segments de spore (2.5 μ).

Un des spécimens récoltés à Yangambi en mars 1947, sur le même hôte et dans les mêmes conditions écologiques que les spécimens typiques, possédait à la fois des clavules vieilles à périthèces vides caractéristiques de *C. crinalis* et d'autres clavules d'un aspect tout différent. Ces dernières, plus trapues, à ramifications nombreuses et très courtes sont brun cendré à la base, jaune ocre vers le haut et blanchâtres au sommet. Elles portent en outre, étagées sur toute leur hauteur, des boursouflures pulvinées, irrégulières, jaune ocre, ocre ou blanchâtres, constituées par un amas serré d'hyphes stériles étroitement enchevêtrées. Ces coussinets ne portent ni périthèces ni forme conidienne. Certaines de ces clavules naissent à la base d'un stroma typique de *C. crinalis* et n'en constituent, en fait, qu'une ramification.

L'aspect de ces stromas est identique à celui d'une des deux formes attribuées par Möller (25) à l'espèce qu'il décrivit sous le nom de *C. ainictos*. Plus tard Petch (35) identifia la forme à périthèces superficiels de *C. ainictos* à *C. ramosa* Petch (donc à *C. crinalis* Ellis et Everhart) et conserva la dénomination de Möller à la forme qui possède des capitules pulvinés latéraux ou terminaux. Petch estimait en effet que Möller s'était trouvé en présence de deux espèces colonisant simultanément le même hôte.

Petch (35), dans sa conception de *C. ainictos* Möller, attribue à cette espèce un capitule différencié à périthèces immergés sous une cuticule continue.

Les stromas que nous avons décrits ne possèdent pas de cuticule différenciée et sont stériles. De plus, les masses pulvinées qui simulent un capitule latéral de *C. ainictos*, se forment sur des ramifications de stromas appartenant indubitablement à *C. crinalis* Ellis et Everhart. Il est donc probable que nous sommes ici en présence de malformations provoquées par un insecte hyperparasite (probablement un diptère du groupe des *Cecidomiae*) qui pond ses œufs dans les tissus des stromas et en provoque la prolifération. Ce phénomène a déjà été observé par

nous sur les clavules de *C. bicephala* Berk (26) où cet hyperparasitisme entraîne généralement la stérilité partielle ou totale.

La synonymie de *Cordyceps (Eucordyceps) crinalis* Ellis et Everhart s'établit donc comme suit :

Cordyceps crinalis Ellis et Everhart (3)
Cordyceps crinalis Ellis ex Lloyd (23) comb. rejic.
Cordyceps ramosa Petch (35).

3. Cordyceps (Eucordyceps) deflectens Penzig et Sacc. (27)

Planches 1 et 4, fig. 3.

Le seul spécimen de cette espèce a été récolté en août 1947, dans la forêt guinéenne de Yangambi.

Il poussait sur un groupe de petites pupes indéterminables (Coléoptères ou Orthoptères) enfermées dans un cocon fait des déjections agglomérées d'un insecte xylophage. Ce cocon, très petit, était inséré sous l'écorce en partie desquamée d'un arbuste du sous-bois, à 1,20 m environ au-dessus de la surface du sol. Il n'existait pas de mycélium superficiel.

La clavule est entièrement blanche et translucide à l'état frais. L'on distingue aisément le tissu axial qui est blanc et opaque du revêtement superficiel qui est translucide et luisant. La clavule mesure 25 mm de hauteur totale, est filiforme, flexueuse et renflée à proximité du sommet en un capitule fusiforme surmonté d'un apex acuminé qui porte, lui aussi, quelques périthèces isolés.

Le stipe est grêle, flexueux et courbé vers le bas sous le poids du capitule. Il est constitué d'un tissu axial blanc pur et opaque protégé par un revêtement superficiel incolore et translucide. Sa surface est lisse et luisante à l'état frais. En se desséchant, il devient entièrement blanc sale, opaque et mat et prend la consistance de la corne. Il est alors ridé longitudinalement. Il mesure 20 mm de haut sur 0,2 à 0,3 mm de section. Les tissus axiaux du stipe se prolongent à travers le capitule jusqu'à l'apex. Quelques périthèces isolés peuvent se former sur le stipe à proximité du capitule comme il s'en forme sur l'apex.

La zone fertile de la clavule n'est donc pas limitée à l'épaississement du stroma mais déborde sur le stipe et sur le sommet acuminé. Elle est indéfinie, mais terminale. Les périthèces sont cependant plus nombreux et plus serrés sur la portion renflée de la clavule dessinant

ainsi un capitule hérissé par leur sommet très saillant. Ce capitule est blanc, ponctué d'ambre clair par l'ostiole des périthèces. Il mesure 4 mm de haut sur 1 mm de section.

Les périthèces se forment au sein d'un tissu superficiel blanc pur et mat, formé d'hyphes hyalines très lâchement enchevêtrées et molles. Ce tissu est fugace et s'affaisse ou disparaît au fur et à mesure du développement des périthèces, à la base desquels on en retrouve quelques lambeaux apprimés. Ceux-ci sont donc entièrement libres dès avant qu'ils aient atteint leur développement complet. Ils sont piriformes, presque globuleux, parfois coiffés d'une sorte de papille pointue constituée par des restes du tissu au sein duquel ils se sont formés. Leur paroi est translucide mais leur contenu est blanc opaque. Leur sommet est parfois coloré en ambre clair. Ils mesurent 260 à 370 μ de haut sur 230 à 300 μ de diamètre maximum.

Les asques sont cylindriques, hyalins, octosporés, coiffés d'un capuchon assez épais et atténués vers la base en un pédicelle court et robuste. Ils mesurent 80 à 100 μ de long sur 4 à 6 μ de diamètre.

Les spores sont filiformes, hyalines et multiseptées. Elles sont à peu près aussi longues que l'asque dont elles sortent et se scindent dès leur libération en segments bacillaires à extrémités tronquées de 5 à 8 μ de long sur 1,5 à 2 μ d'épaisseur.

La diagnose de Penzig et Saccardo (**27**) coïncide très nettement avec la description de notre spécimen en ce qui concerne la teinte, la consistance et la structure du stipe et du capitule, de même qu'en ce qui concerne la disposition des périthèces sur la clavule. La forme des périthèces est sensiblement la même (globoso sphaerica, papillata) de même que leur taille (350-370 μ). Les deux descriptions diffèrent cependant par :

1° la forme de la clavule : ramifiée chez le type;
2° la taille des asques : plus grande chez le type;
3° la taille des spores : également plus grande;
4° la nature de l'hôte : une chenille chez le type.

Les auteurs ne décrivent malheureusement pas les segments de spore.

Petch décrivit, en 1924, (**28**) sous le nom de *C. translucens*, une espèce qui elle aussi ressemble très fort à notre spécimen. *C. translucens* Petch pousse sur coléoptère, mais diffère de notre exemplaire par :

1° son capitule globuleux ou ovoïde plus nettement défini,

2° la forme légèrement différente de ses périthèces (en cône large ou en forme de bouteille à goulot très court et très large),

3° la taille des périthèces (500 × 300 μ).

Petch signale toutefois l'existence de périthèces isolés sur le stipe de sorte que la zone fertile de la clavule n'est pas aussi nettement distincte du stipe que ne pourrait le faire croire la diagnose. *C. translucens* possède selon Petch des segments de spore de 6 × 1 μ et le diamètre de ses asques serait de 4 μ.

En ce qui concerne les caractères macroscopiques, les diagnoses de Petch, pour *C. translucens* et de Penzig et Saccardo pour *C. deflectens* ne diffèrent que par le fait que la clavule de *C. deflectens* est ramifiée et pousse sur une chenille alors que celle de *C. translucens* est simple et pousse sur coléoptère. A ce point de vue notre spécimen ressemble davantage à l'espèce décrite par Petch.

En ce qui concerne les caractères microscopiques, la distinction entre ces deux espèces n'est pas aisée. Elle repose en effet sur la taille des périthèces plutôt que sur leur forme. Il n'existe guère de différence entre des périthèces « globoso-sphaerica, papillata » et des périthèces en cône large ou en forme de bouteille à goulot court et très large. Il s'agit là, semble-t-il d'une divergence de termes ou d'interprétation plutôt que d'une divergence réelle de forme. Si l'on en tient compte, il faudrait admettre que, au point de vue de ces caractères microscopiques, notre spécimen ressemblerait davantage à *C. deflectens*, qu'à *C. translucens*.

Nous serions donc en présence d'un spécimen qui posséderait à la fois des caractéristiques spécifiques de *C. deflectens* Penzig et Saccardo et des caractéristiques spécifiques de *C. translucens* Petch. Il s'agirait donc d'une forme intermédiaire entre ces deux espèces.

La valeur taxonomique des caractères évoqués pour faire la distinction entre *C. deflectens* et *C. translucens* n'est pas suffisante pour maintenir ces deux espèces.

Le fait que le stroma soit ramifié chez l'une et simple chez l'autre peut être accidentel et n'est pas un caractère constant chez bien d'autres espèces de *Cordyceps*. Il en est de même en ce qui concerne la nature de l'hôte. Quant à la taille des périthèces, des asques, des spores et des segments de spore, spécialement quand il s'agit d'espèces à périthèces superficiels, elle varie parfois du simple au double sur le même spécimen. En ce qui concerne la forme des périthèces qui, elle, constitue un caractère généralement stable, il semble bien que dans le cas particulier qui nous occupe, la différence réside essentiellement dans les termes utilisés pour la décrire et l'interprétation qu'on leur donne. Les périthèces de *C. deflectens* ont une forme très semblable à celle des périthèces de

C. translucens, sinon identique. Par ailleurs, si l'on accepte les divergences exprimées par les auteurs, il faudrait admettre que notre spécimen possède des périthèces dont la forme et la taille sont intermédiaires entre la forme et la taille de ces mêmes organes chez *C. deflectens* et *C. translucens*.

Il est plus logique de considérer que les termes employés par les auteurs décrivent les extrêmes des variations que peut subir la forme des périthèces chez une seule et même espèce.

Dans ces conditions, l'espèce de Petch ne peut pas être maintenue et doit tomber en synonymie avec celle de Penzig et Saccardo. Notre spécimen appartient donc à l'espèce *C. deflectens* Penzig et Saccardo.

Synonymie de *Cordyceps (Eucordyceps) deflectens* Penzig et Saccardo.

C. deflectens Penzig et Saccardo (**27**)
C. translucens Petch (**28**).

4. Cordyceps (Eucordyceps) engleriana P. Hennings (Petch **34**)

Planches 1 et 4, fig. 4.

Le seul exemplaire qu'il nous ait été donné d'étudier a été récolté en forêt guinéenne, à Yangambi, en 1947.

Les stromas se développaient sur le cadavre d'une araignée grise, à corps très plat et à mouvements très rapides, très commune sur l'écorce des arbres dans le sous-bois forestier *(Sparassidae)*.

L'hôte, dont la teinte se confond le plus souvent avec celle du support, est fixé à l'écorce par des filaments mycéliens grisâtres très ténus et peu visibles, sortant de toutes les parties du corps mais plus spécialement des pattes. Il porte cinq clavules fertiles et trois clavules dépourvues de périthèces, mais terminées par une touffe d'aspect cotonneux et pulvérulent qui produit des conidies.

Les clavules émergent de toutes les parties du corps de l'hôte. Elles sont de petite taille (1 à 5 mm de hauteur) et composées d'un stipe grêle et court et d'une portion fertile pulvinée, latérale ou entourant plus ou moins le stipe. Elle se prolonge au-delà en un appendice assez long, généralement aplati en un ruban flexueux et tordu sur lui-même qui se termine en une touffe floconneuse et pulvérulente portant des conidies.

Le stipe, plus ou moins cylindrique, est tortueux et souvent recourbé dès la base. Il se coude une seconde fois, presque à angle droit, au

niveau de l'épaississement pulviné qu'il porte sur la face convexe de sa courbure, et sur lequel se forment les périthèces. Il est finement tomenteux, brun jaunâtre à la base et jaune sale à proximité du capitule. L'appendice rubanné est gris cendré et la touffe terminale est blanchâtre. Le stipe mesure 1 à 3 mm de haut de la base au capitule et son diamètre varie de 0,2 à la base à 0,5 au niveau du capitule.

Les périthèces sont cespiteux, en groupe de 5 à 30 selon la vigueur du capitule. Il en existe qui sont isolés sur le stipe. Ils se forment au sein d'un tissu floconneux, très lâche, brun jaunâtre, identique au tomentum du stipe mais plus fourni, qui couvre le capitule. Ils s'en dégagent très tôt au cours du développement et apparaissent, dès avant leur maturité complète, quasi entièrement libres. Quand ils sont isolés sur le stipe, ils sont souvent nettement plus grands et souvent portés sur un pédicelle très court de même structure que le stipe. Ils sont ovoïdes-allongés ou fusiformes. Leur paroi est brun jaunâtre, concolore au tissu superficiel du capitule ou d'un jaune un peu plus vif. Leur ostiole est brun sombre. Quand ils sont groupés sur le capitule, ils mesurent 650 à 900 μ de haut sur 300 à 400 μ de diamètre. Isolés sur le stipe ils dépassent souvent 1.000 μ de haut sur 300 à 500 μ de diamètre. Leur paroi est lisse, assez résistante, mais ne possède pas de structure particulière. A maturité complète, on retrouve, apprimés à leur base, les lambeaux du tissu lâche au sein duquel ils se sont formés.

Les asques sont cylindriques, flexueux, octosporés, atténués vers la base en un pédicelle filiforme souvent très long. Ils sont coiffés d'un capuchon hyalin globuleux, bien distinct. Ils mesurent 600 à 800 μ de long sur 6 à 10 μ d'épaisseur.

Les spores sont hyalines, multiseptées, de 50 à 60 μ plus courtes que l'asque dont elles sortent. Leur épaisseur varie de 1,5 à 2 μ. Elles se scindent aisément en segments bacillaires à extrémités obtuses plus ou moins arrondies de longueur très variable : 15, 20, 30 μ.

Par ses caractères macroscopiques et la forme et la taille de ses périthèces, notre spécimen correspond exactement à la description que donne P. Hennings de *C. engleriana.*

Contrairement à ce qu'avance Petch (**34**), Hennings ne s'est pas trompé en ce qui concerne le diamètre des asques : celui-ci est bien de 6 à 10 μ, non pas de 5 μ.

Mains (**14, 23**) a décrit sous le nom de *C. Thaxteri* une espèce très voisine de *C. engleriana* P. Hennings. Elle s'en distingue par la coloration brunâtre des périthèces, l'absence d'appendice filiforme ou rubanné, le diamètres des asques et les dimensions des segments de spore. Mains

ajoute « There is some indication of tendency to the development of a perithecial layer in the villose condition of the stromata and perithecia, which, however, are free and superficial ». Il est bien probable que *C. Thaxteri* Mains n'est rien d'autre qu'une forme grêle et malformée de *C. engleriana* P. Hennings.

Petch (34) semblerait enclin à considérer *C. flavo-viridis* Möller comme synonyme de *C. engleriana* P. Hennings. Cette conception ne nous paraît pas admissible car *C. flavo-viridis* possède un stroma nettement plus différencié.

5. Cordyceps (Eucordyceps) variabilis Petch (35) non sensu Mains (23)

Planches 2 et 4, fig. 5.

Nous avons récolté le spécimen que nous décrivons, le 28 août 1958, dans la forêt humide de montagne, près d'Irangi, sur le versant ouest du Graben (altitude 950 m).

Il pousse sur une larve de coléoptère morte à l'intérieur de sa galerie, dans le bois pourrissant et enrobée dans un feutrage mycélien blanc. Seule la portion supérieure de la clavule émerge du bois. La galerie est bouchée par les déjections de la larve.

La clavule est de petite taille mais d'aspect robuste. Elle mesure 6 mm de hauteur totale.

Le stype est cylindrique, blanc fauve dans sa moitié inférieure qui est enfouie dans les déjections de l'hôte, et blanc pur dans sa moitié supérieure qui émerge à l'air libre. Il mesure 4 mm de haut sur 0,5 à 1 mm de section. Il est légèrement plus épais dans sa portion supérieure dégagée. Il est fibro-charnu et couvert d'un tomentum blanc, très serré. Il se tache de fauve à l'endroit où on le froisse.

Le capitule est un renflement pulviné qui coiffe latéralement le stipe dont il ne couvre complètement que le sommet. Le sommet de la clavule est donc obtus et fertile. La surface du capitule est hérissée par les périthèces saillants sous un tomentum blanc, assez lâche qui, en s'affaissant, les moule et ne laisse à nu que l'ostiole. Sa teinte générale est blanche, nuancée de fauve et ponctuée de brun olivâtre par les ostioles qui sont aussi translucides. Le capitule mesure 2 mm de haut sur 1,5 de diamètre et porte une trentaine de périthèces.

Les périthèces sont insérés obliquement sous un tissu blanc teinté de fauve, lâche mais analogue au tomentum qui couvre le sommet du

stipe. Ce tissu s'affaisse au cours de leur développement en s'apprimant à leur paroi, ce qui les fait paraître libres sur la majeure partie de leur hauteur quand ils sont arrivés à leur maturité complète. En réalité, ils restent donc entièrement couverts par ce tissu qui les moule, l'ostiole seul étant nu. Ils sont ovoïdes, à col large et à paroi mince sauf au niveau de l'ostiole où elle s'épaissit en une sorte de bourrelet circulaire. L'ostiole est obtus, nu, translucide et teinté de fauve pâle quand on l'observe sous le microscope. Les périthèces mesurent 400 à 500 μ de haut sur 215 à 300 μ de diamètre.

Les asques sont cylindriques ou légèrement clavés, flexueux, hyalins et atténués à la base en un pédicelle effilé. Ils mesurent 360 à 420 μ de long sur 10 à 15 μ de diamètre maximum. Ils sont coiffés d'un capuchon hyalin très distinct et contiennent 8 spores.

Les spores sont hyalines, filiformes, flexueuses et multiseptées. Elles sont de 25 à 50 μ plus courtes que l'asque dont elles sortent et se scindent aisément en segments bacillaires à bouts arrondis de 6 à 8 μ de long sur 2 à 3 μ d'épaisseur.

Cette description correspond exactement à la diagnose de Petch (**35**) pour *C. variabilis* Petch mais non pas à la conception que se fait Mains (**23**) de cette espèce.

Mains attribue à l'espèce de Petch une cuticule superficielle pseudo-parenchymateuse. Petch ne signale pas cette particularité dans sa diagnose alors que, dans toute son œuvre, cet auteur insiste sur la valeur taxonomique de ce caractère. Si *C. variabilis* possédait une cuticule elle n'aurait certainement pas échappé à son observation.

Notre spécimen ne possède pas de cuticule différenciée et appartient donc bien à l'espèce de Petch.

La conception que s'en fait Mains correspond à celle d'une espèce qu'il a lui-même décrite en 1937 (**13**) sous le nom de *C. viperina* Mains et qu'il fait tomber en 1958, en synonymie avec *C. variabilis* Petch (**23**). Cette synonymie n'est pas admissible. *C. variabilis* Petch et *C. viperina* Mains sont des espèces nettement distinctes.

C. variabilis est une espèce très variable, comme son nom l'indique. Elle est très voisine de *C. coccinea* var. *subochracea* Penzig et Saccardo (**27, 38**). Elle en diffère uniquement par le fait que son capitule est nettement plus latéral et par ses périthèces nettement plus saillants.

6. Cordyceps (Eucordyceps) takaomontana Yakusiji et Kumazawa (8)

Planches 2 et 4, fig. 6.

Nous n'avons récolté qu'un seul exemplaire de cette espèce. Il poussait sur une larve de coléoptère enfermée dans un cocon fait des fibres agglomérées d'un pédoncule d'inflorescence mâle d'*Elaeis guineensis* Jacq. Nous l'avons récolté dans une palmeraie, à Yangambi, en 1947.

Vingt-deux clavules émergent de l'hôte qui, à l'intérieur de son « cocon » est enrobé dans un mycélium membraneux, blanc. Trois stromas stipités, ramifiés se terminent par des masses floconneuses et pulvérulentes, blanches constituant vraisemblablement le stade conidien de l'espèce.

Ces clavules, grégaires et parfois cespiteuses, mesurent 5 à 15 mm de haut. Elles sont simples mais leur sommet fertile est parfois dichotome. Elles ont la forme de petites massues jaunâtres.

Le stipe est d'aspect robuste. Il est souvent courbé à son point d'insertion sur l'hôte. Il est cylindrique mais s'épaissit à proximité du capitule. Il mesure 2 à 12 mm de haut sur 0,5 et 1 mm de section. Il est pelucheux et sa teinte est ambrée, très pâle.

La portion terminale de la clavule est épaissie en un capitule cylindrique ou clavé, deux fois plus épais que le stipe et à sommet arrondi. Ce capitule est inséré obliquement sur le stipe. Son arête basale est souvent fendue en V renversé. Sa teinte est ambrée ou jaune de miel, ponctuée d'ambre foncé. Sa surface est légèrement scabre par suite des saillies que font les sommets des périthèces.

Les périthèces sont immergés dans un tissu pulviné relativement mou et d'aspect pelucheux. Ils ne se dégagent pas de ce tissu dans lequel ils restent enfouis jusqu'au niveau de l'ostiole. Cependant, par temps sec, ce revêtement superficiel du capitule s'affaisse en moulant le sommet des périthèces qui paraissent ainsi saillant sur 1/3 environ de leur hauteur. Il n'existe ni cuticule superficielle ni couche périthéciigère différenciée. Les périthèces sont ovales ou ovoïdes, à col très court. Leur paroi est mince et colorée en un jaune plus foncé que les hyphes du revêtement superficiel du stroma. Ils mesurent 440 à 560 μ de haut sur 230 à 350 μ de diamètre maximum.

Les asques sont cylindriques, hyalins, nettement capités et octosporés. Ils mesurent 280 à 360 μ de long sur 3 à 4 μ d'épaisseur.

Les spores sont filiformes, hyalines, multiseptées, de 260 à 320 μ de long sur 1,5 à 2,5 μ d'épaisseur. Elles se scindent aisément, après leur libération, en segments bacillaires à extrémités obtuses de 5 à 8 μ de long.

Cette espèce est très voisine de *C. typhulaeformis* Berk. et Cooke sensu Petch (**32**) mais s'en distingue par :

1° la coloration beaucoup plus pâle du stroma et l'absence d'appendice stérile;

2° l'abondance des clavules sur le même hôte et l'absence de stromas ramifiés;

3° la taille plus faible des périthèces;

4° les asques plus courts et moins épais;

5° la taille beaucoup plus variable des segments de spore.

Notre spécimen possède des caractéristiques identiques à celles que Kobayasi (**8**) attribue à *C. takaomontana* Yakusiji et Kumazawa, c'est pourquoi nous l'identifions à cette dernière espèce.

Cependant, nous estimons que les caractères qui permettent de distinguer *C. takaomontana* de *C. typhulaeformis* n'ont guère de valeur taxonomique et nous sommes persuadés qu'une étude approfondie d'un assez grand nombre de spécimens nous amènerait à conclure à la synonymie de ces deux dénominations.

7. Cordyceps (Eucordyceps) miniata Moureau (sp. nov.)

Planches 2 et 5, fig. 7.

Un seul spécimen de cette espèce a été récolté en août 1947, à Yangambi, sur le sol, parmi les feuilles mortes en forêt guinéenne. Il poussait sur le cadavre d'une chrysalide enfermé dans un cocon soyeux logé entre deux feuilles mortes qu'il maintenait accolées.

Deux clavules robustes et charnues émergent, au travers d'une des feuilles, du cocon qui est lui-même enrobé dans un mycélium membraneux peu abondant mais continu, blanc sale, maculé de brun rouille ou d'orangé brunâtre. Elles mesurent l'une 25 mm et l'autre 30 mm de haut. Elles sont courbées en forme de faucille et leur teinte générale est orangé rougeâtre (couleur de minium) avec un aspect mat et velouté. A sec, cette teinte vire au brun rouille ou terre de Sienne clair. Ses nuances sont plus vives sur la portion fertile que sur le stipe.

Le stipe est robuste, charnu, tortueux et courbé, déformé par des sillons longitudinaux et comprimé latéralement. Il est glabre bien que

son aspect mat et velouté puisse faire croire à l'existence d'un tomentum ras. Sa teinte est roux orangé à l'état frais et roux clair sur les exemplaires desséchés. Il mesure 12 à 15 mm de hauteur sur 2 mm de section.

La portion fertile occupe la moitié supérieure de la clavule et sa limite inférieure n'est guère marquée, à l'œil nu, que par la nuance plus vive de sa coloration. Elle est cylindrique-clavée et s'amincit insensiblement vers le haut en un sommet plus ou moins pointu mais fertile. Elle est confluente au stipe vers le bas où son insertion est oblique et fendue en V renversé. A l'état frais sa teinte est orangé rougeâtre, couleur de minium, très vive. A l'état sec elle perd cette nuance dominante rouge pour virer au roux vif ou au terre de Sienne clair. Sa surface est aspérulée-ridée. Chaque saillie correspond à un périthèce dont l'ostiole érompant ponctue le capitule de brun grisâtre. Les périthèces sont relativement peu nombreux et assez dispersés. L'aspect aspérulé s'atténue vers le haut et le sommet est généralement uni. Cette zone est cependant fertile mais les périthèces non encore mûrs n'y provoquent pas de saillies. La maturation des périthèces est donc acropète et assez lente. La portion fertile mesure 12 à 15 mm de haut sur 2,5 mm de section maximale. Les tissus internes sont blancs et il n'existe pas de couche périthéciigère distincte.

Les périthèces sont insérés plus ou moins obliquement par rapport à la surface du stroma. Ils se forment au sein d'un tissu blanc, homogène, couvert d'un revêtement lâche formé d'hyphes lâchement enchevêtrées, brun rouge à l'état frais, rousses après dessiccation. Ce tissu lâche les couvre entièrement en les moulant au fur et à mesure de leur développement. A leur maturité complète, l'ostiole seul s'en dégage. Avant leur maturité (ce qui se présente souvent au sommet du capitule), les périthèces sont ovoïdes à col court et mesurent 260 à 300 μ de haut sur 170 à 200 μ de diamètre. Par contre, à maturité complète, ils sont globuleux, parfois affaissés, de sorte que leur diamètre peut excéder leur hauteur. Ils mesurent alors 250 à 350 μ de haut sur 275 à 320 μ de diamètre. Leur paroi, sans structure particulière, est mince et colorée en jaune sale. L'ostiole n'est pas papillé.

Les asques sont cylindriques, flexueux, octosporés, très nettement capités et atténués à la base en un pédicelle court et robuste. Ils mesurent 135 à 170 μ de long sur 3 à 5 μ d'épaisseur.

Les spores sont hyalines filiformes, multiseptées et à peu près aussi longues que l'asque dont elles sortent. Elle se scindent aisément, au moment de leur libération, en segments cylindriques à extrémités arrondies, de 8 à 10 μ de long sur 1 à 1,5 μ de diamètre.

C. miniata Moureau est une espèce très voisine de *C. martialis* Spegazzini (**39**), à laquelle elle ressemble par la plupart de ses caractères macroscopiques. Elle en diffère par :

1° la forme des périthèces qui sont chez *C. martialis*, globuleux à long col selon Spegazzini (**39**) et Saccardo (**38**) et ovoïdes selon Mains (**23**) et Petch (**32**) ;

2° leur taille qui, chez *C. martialis*, serait de 500 à 600 μ selon Saccardo et pourrait atteindre 800 μ selon Mains ;

3° la taille des asques : 300 à 510 μ chez *C. Martialis* selon Mains ;

4° l'existence chez *C. martialis*, selon Petch, d'une couche périthéciigère distincte, noire qui a d'ailleurs amené Petch à considérer *C. martialis* comme un synonyme de *C. submilitaris* P. Hennings.

Par la forme et la taille des périthèces, *C. miniata* est voisine de *C. hormospora* Möller (**25**) mais elle se distingue de cette espèce, que Petch (**30**) considère d'ailleurs comme synonyme de *C. palustris* Berk (**3**), par la forme et la texture de la clavule, par sa teinte roussâtre au lieu de rouge vineux et la nature de l'hôte.

Elle est aussi très voisine de *C. variegata* Moureau (**26**) mais s'en distingue nettement par la forme et la taille des périthèces et par l'absence d'une couche périthéciigère distincte. En voici la diagnose latine :

Cordyceps (Eucordyceps) miniata sp. nov.

Stromatibus gregariis, simplicibus, contortis et curvatis, clavatis, robustis, carnosis, miniatis (siccis, rufis) ex Lepidoteri nympha inter folias sepulta et mycelio albo, brunneo aut miniato-maculato tecta, oriundis, 25 aut 30 mm altis.

Stipite robusto, carnoso, curvato et contorto, lateraliter depresso, laete miniato (sicco, pallide rufo), intus albo, 12-15 mm alto et 2 mm crasso.

Capitulo terminale, cylindrico plus minusve clavato, apice attenuato sed rotundato, a stipite distincto sed confluente et basi oblique inserto, intus albo, extus vivide miniato aut aurantio-miniato (sicco rufo aut rufo-brunneo) plus minusve peritheciis prominulentibus verrucoso sed apice lento; 10-15 mm alto et 2,5 mm crasso.

Peritheciis non numerosis, sparsis, plus minusve oblique insertis, primo in peridio laxo rufo-brunneo immersis, deinde peridio appresso tectis, ostiolo nudis; primo (quando immaturis) ovoideis cum colle breve, 260-300 altis et 170-200 μ crassis; deinde

(quando maturis) globosis vel depressis 250-350 altis et 275-320 μ crassis; peridio albo-luteis.

Ascis cylindraceo-clavatis, flexuosis, octosporidiis, crassiter capitatis et pedicellatis, 135-170 μ longis et 3-5 μ crassis.

Sporidiis hyalinibus, filiformibus, multiseptatis, apud ascorum longitudine, in articulos cylindraceos, apicibus rotundatos 8-10 μ longos et 1-1,5 μ crassos secendentibus.

In Lepidoteri nympha.

Yangambi, Congo, augustus 1947.

Le spécimen-type a été déposé dans l'Herbarium du Centre de Recherches de l'Institut pour la Recherche Scientifique en Afrique Centrale, à Mabali (Bikoro) Province de l'Equateur, République du Congo (Léopoldville), sous le n° 448 de la Collection J. Moureau.

8. Cordyceps (Eucordyceps) cinnabarina Petch (33)

Planches 2 et 5, fig. 8.

Un spécimen de cette espèce a été récolté en forêt guinéenne tropophylle, parmi les feuilles mortes à Bambesa (Uele) en décembre 1943.

Il pousse sur le cadavre d'une grosse chenille velue.

L'hôte porte de nombreuses clavules (15 à 20) qui en sont chacune à un stade de développement différent. Elles se forment de part et d'autre de la face ventrale du cadavre et semblent naître des stigmates. Il n'existe pas la moindre trace de mycélium superficiel. Les clavules jeunes sont couvertes d'une pruine abondante blanche ou rosée. Cette pruine est fugace et disparaît progressivement au cours du développement de la clavule mais le sommet en reste toujours couvert. Quand les clavules ont atteint leur développement complet, elles sont assez nettement différenciées en un stipe et un capitule clavé ou cylindrique-clavé, aminci vers le sommet mais non pointu. Elles mesurent alors 20 à 25 mm de hauteur.

Le stipe est cylindrique, robuste, rigide, dressé, à base bulbeuse. Il est brun fauve (mars yellow de Ridgway) à la base, passe au fauve brunâtre, puis au fauve et enfin à l'ocre vers le haut pour prendre une teinte jaune vif, à proximité du capitule. Il mesure 4 à 15 mm de haut sur 1 mm de section. Sa base bulbeuse atteint un diamètre de 2,5 mm. Il est tomenteux, velouté.

Le capitule est, à sa base, à peine plus épais que le stipe, confluent à ce dernier mais nettement distinct du fait que sa teinte est rosée ou blanche et qu'il est pruineux. Sous cette pruine, le capitule est rouge

vermillon très vif (flame scarlet de Ridgway) teinte qu'il prend d'ailleurs quand il atteint son développement complet. A ce stade cependant son sommet reste toujours couvert de la pruine blanche qui l'enrobait tout entier au début de son développement. La nuance rouge se ternit au cours de la dessiccation et devient brun rougeâtre (mars orange de Ridgway). Le capitule est cylindrique ou plus ou moins clavé. Il s'amincit vers le haut mais son sommet est obtus et fertile. Il mesure 10 à 12 mm de haut sur 1,5 à 2 mm de section maximale. Sous la loupe, sa surface apparaît finement aspérulée-réticulée et ponctuée de rouge vermillon par le sommet d'une multitude de périthèces surmontés d'une papille translucide.

Les périthèces sont extrêmement nombreux et serrés. Ils sont d'abord immergés totalement dans le tissu externe blanchâtre du stroma, perpendiculairement à la surface de ce dernier. Leur ostiole émerge progressivement de ce tissu formé d'hyphes lâchement enchevêtrées qui s'affaisse et se déchire à mesure que les périthèces se développent. Ce sont les restes de ce tissu qui constituent la pruine blanche dont nous avons signalé la présence sur le capitule. Le sommet des périthèces se dégage finalement entièrement de cette pruine de sorte que ceux-ci paraissent libres sur la moitié ou les deux tiers de leur hauteur. Dans leur portion libre ils sont couverts d'un revêtement tomenteux rouge vermillon ou orangé très vif. Ils sont surmontés d'une papille translucide jaune brunâtre ou brun fauve. Ils sont ovoïdes, souvent comprimés latéralement à la base et étranglés au niveau de l'ostiole, ce qui leur donne la forme d'une amphore. Leur paroi est simple mais tomenteuse et même pelucheuse vers l'extérieur. Elle s'épaissit vers le haut et forme un bourrelet circulaire autour d'un col court et large. Cette paroi est brun rougeâtre ou brun jaunâtre sous le microscope. Elle est constituée d'hyphes densément enchevêtrées dont les bouts émergent sur une longueur de 5 à 10 μ et forment le tomentum rouge ou orangé décrit plus haut. Les périthèces mesurent 320 à 370 μ de haut sur 135 à 175 μ de diamètre.

Les asques sont cylindriques, grêles et coiffés d'un capuchon glandiforme hyalin. Ils n'étaient malheureusement pas mûrs de sorte que nous n'avons pas pu les étudier davantage ni observer les spores et les segments de spore.

Par tous ses caractères notre spécimen ressemble exactement à celui que Petch décrivit sous le nom de *C. cinnabarina* (33). L'auteur, lui non plus, n'a pas pu observer de spores ni de segments de spore. Il ne fait cependant aucun doute qu'il s'agit bien d'un *Cordyceps* et que l'espèce créée par Petch est à conserver.

9. Cordyceps (Eucordyceps) pruinosa Petch (28)

Planches 3 et 5, fig. 9.

Cette espèce est relativement rare. Nous en avons récolté un exemplaire en juillet 1947, à Yangambi, parmi les feuilles mortes d'un vallon humide de la forêt guinéenne et un second, en mai 1956, à Mabali, sur la litière de débris végétaux de la forêt marécageuse.

Les deux spécimens poussaient sur le cocon sphérique brun noir d'une chrysalide. Ce cocon, de 10 à 15 mm de diamètre, était enfoui parmi les feuilles mortes et les brindilles gorgées d'eau du sous-bois. Les clavules s'étaient développées dans une atmosphère saturée d'eau.

La clavule, solitaire, est entièrement d'un rouge cramoisi très vif, parfois nuancé de carmin. Elle mesure 25 à 30 mm de hauteur totale.

Le stipe est cylindrique, charnu, plus ou moins tortueux. Il s'épaissit légèrement vers le haut mais s'étrangle parfois immédiatement sous le capitule. Il est lisse et très finement tomenteux et émerge d'une masse de débris de la litière agglomérés par un mycélium blanc. Ce mycélium n'enrobe cependant pas le cocon. Le stipe mesure 20 à 25 mm de haut sur 1 à 1,5 mm de section.

Le capitule est cylindrique-clavé, à sommet arrondi et fertile et souvent comprimé latéralement. Son insertion sur le stipe est bien distincte, oblique et fendue en V renversé. Il est parfois déformé par un bourrelet latéral plus ou moins accentué. Il est concolore au stipe mais finement aspérulé et moucheté de carmin foncé ou de violet par les sommets saillants des périthèces. Il est entièrement couvert d'un tomentum cramoisi qui s'affaisse entre les sommets des périthèces, à maturité, et peut s'écailler en séchant, pour former une légère pruine rouge. Ce revêtement externe du capitule moule les sommets des périthèces dans une gaîne d'aspect pelucheux sous le microscope qui ne laisse à nu que l'ostiole surmonté d'une papille translucide. Le capitule mesure 8 à 9 mm de haut sur 2,5 à 3 mm de diamètre maximum.

Les périthèces sont insérés perpendiculairement à la surface, sous le revêtement externe rouge du capitule. A maturité complète ils font saillie, sous ce revêtement qui les moule, sur près de la moitié de leur hauteur. Ils sont ovales étirés ou en forme de massue, insensiblement amincie vers le haut, à col très court assez étroit, et surmontés d'une papille hémisphérique, translucide. Leur paroi est relativement mince et colorée en jaune ambré. Ils mesurent 300 à 400 μ de haut sur 150 à 200 μ de diamètre.

Les asques, hyalins, octosporés, sont cylindriques, atténués à la base en un pédicelle de longueur variable et coiffés d'un capuchon hyalin hémisphérique. Ils mesurent 200 à 300 μ de long sur 3 à 4 μ de section.

Les spores, filiformes et multiseptées, sont de 20 à 30 μ plus courtes que l'asque dont elles sortent. Elles mesurent 170 à 280 μ de long sur 0,5 à 1 μ d'épaisseur. Elles se scindent aisément, à maturité, en segments cylindriques à extrémités tronquées, de 6 à 10 μ de long.

Nos spécimens correspondent à la description que donne Kobayasi (**8**) des exemplaires de *C. pruinosa* Petch récoltés au Japon. Ils n'en diffèrent que par la longueur plus grande des asques, des spores et des segments de spore. A ce dernier point de vue, ils ressemblent davantage au spécimen décrit par Petch.

Petch (**28**) signale que la pruine rouge, qu'il a observée entre les périthèces et qui est constituée par les restes du tissu superficiel du stroma, vire au violet en présence de KOH. Ce fait n'a pas été observé sur nos spécimens.

C. pruinosa Petch est une espèce très voisine de *C. coccinea* Penzig et Saccardo. Elle s'en distingue cependant, non seulement par la nature de l'hôte mais encore par la taille plus grande de la clavule, le capitule plus nettement différencié et surtout par la coloration des parois des périthèces et de celle du revêtement superficiel du stroma.

C. pruinosa Petch est aussi une espèce très voisine de *C. vinosa* Moureau, que nous décrivons ci-dessous.

10. Cordyceps (Eucordyceps) vinosa Moureau (sp. nov.)

Planches 3 et 5, fig. 10.

Nous avons pu étudier, dans leur milieu naturel (la forêt équatoriale de terre ferme) à Mabali, en avril et mai 1960, de très nombreux exemplaires de cette espèce que nous avions précédemment récoltée en forêt guinéenne à Yangambi (mai 1947).

Les exemplaires observés sur les bords du Lac Tumba poussaient sur une chenille dont le cadavre, boudiné, momifié, était entièrement enrobé dans le feutrage membraneux ou ouaté d'un mycélium très abondant, blanc ou blanc rosé qui débordait souvent sur les feuilles mortes adjacentes. Ces chenilles appartiennent à une espèce grégaire qui pullule sur certaines Anonacées arborescentes *(Monodora angolensis)*

de la forêt équatoriale au cours de la petite saison des pluies et dont les populations autochtones sont très friandes. L'un des spécimens récoltés à Yangambi poussait sur une chrysalide enfermée dans son cocon. Le cocon était lui aussi enrobé dans un feutrage mycélien blanc rosé qui le fixait à deux feuilles mortes.

Les clavules sont grégaires, mais parfois solitaires. Elles sont simples mais parfois cespiteuses. Elles sont cylindriques, flexueuses ou tortueuses, charnues et fragiles. Elles s'atténuent imperceptiblement vers le haut en un sommet obtus et fertile. Elles mesurent 15 à 40 mm (parfois 60 mm) de haut sur 1,5 à 2 mm de section. Leur teinte varie du rose pourpré au pourpre foncé en passant par le rouge cramoisi ou le rouge pourpré. Elles sont très putrescibles. En atmosphère confinée saturée d'eau, elles pourrissent rapidement en dégageant de l'ammoniaque. Elles deviennent alors flasques et leur teinte vire au violet ou au violet bleuté.

Le stipe est lisse, charnu, fragile, flexueux ou tortueux mais égal, généralement cylindrique, mais parfois déformé par des dépressions ou des sillons longitudinaux discontinus. A la base il est blanc, blanc teinté de rose pourpré, rouge carminé ou pourpré. Vers le haut, il est toujours rouge pourpré et concolore à la portion fertile de la clavule. Il mesure 10 à 25 mm de haut (parfois jusqu'à 40 mm) et sa section est de 1,5 à 2 mm.

La zone fertile est plus épaisse et, de ce fait, nettement distincte du stipe. Son insertion est oblique et fendue en V renversé. Cette fente se prolonge parfois par un sillon sinueux et irrégulier qui ne s'arrête qu'à proximité du sommet. La forme du capitule est variable. Il peut être cylindrique et très allongé comme il peut être court et clavé. Il peut représenter tantôt le tiers tantôt les deux tiers de la hauteur de la clavule. Il est parfois déformé, à proximité du sommet, par des boursouflures latérales plus ou moins volumineuses. Il est concolore au sommet du stipe mais d'une nuance plus vive. Sa surface est finement mouchetée de pourpre et rendue rugueuse par la papille translucide d'une infinité de périthèces très serrés les uns contre les autres et à sommet à peine saillant. Ses tissus internes sont rouge vif comme le revêtement superficiel. Les premiers sont compacts, le second est formé d'hyphes rouges ou pourpres lâchement enchevêtrées. Ce tissu externe s'affaisse légèrement au cours de la maturation des périthèces en moulant leur sommet qu'il couvre cependant toujours jusqu'au niveau de l'ostiole. Le capitule mesure 5 à 25 mm de haut sur 2 à 2,5 mm de section.

Les périthèces sont totalement immergés dans les tissus du stroma, sous le revêtement superficiel dont ils ne se dégagent pas, même à maturité complète, et qui les couvre jusqu'au niveau de l'ostiole, la papille seule étant à nu. Leur sommet fait légèrement saillie sous ce revêtement qui s'affaisse à peine avec l'âge. Il n'existe cependant pas de cuticule distincte ni de couche différenciée dans les tissus internes du stroma. Les périthèces sont relativement petits, extrêmement nombreux et serrés. Ils sont elliptiques ou en forme de massue courte. Leur col est court et assez étroit et leur papille n'est pas très développée. Leurs parois, minces, s'épaississent légèrement au niveau de l'ostiole et sont colorées en pourpre très vif. Le contenu des périthèces est hyalin. Les périthèces mesurent 260 à 360 μ (320) de haut sur 100 à 180μ (135) de diamètre.

Les asques sont hyalins, cylindriques ou parfois légèrement clavés, non pédicellés ou à pédicelle très court et coiffés d'un capuchon hyalin peu volumineux. Ils sont octosporés et mesurent 150 à 250 μ de long sur 4 à 5 μ d'épaisseur.

Les spores sont flexueuses, hyalines, multiseptées et à peu près aussi longues que l'asque dont elles sortent. Leur épaisseur varie de 1 à 1,5 μ. Elles se scindent aisément en segments bacillaires à extrémités tronquées de 8 à 12 μ de long.

La maturation de cette espèce est très lente et il arrive souvent que les clavules soient détruites par la putréfaction avant d'avoir atteint leur développement complet.

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de diagnose qui puisse s'identifier aux caractéristiques des spécimens que nous venons de décrire. Nous estimons donc être en présence d'une espèce nouvelle à laquelle nous donnons le nom de *Cordyceps (Eucordyceps) vinosa* et dont voici la diagnose latine :

Cordyceps (Eucordyceps) vinosa sp. nov.

Stromatibus solitariis vel gregariis, simplicibus vel ramosis, e lepidopterorum larvis aut chrysalidibus inter foliis sepultis et mycelio superficiale dense, plus minusve pulvinato, albo vel albo-purpurascente tectis, oriundis, 15-40 mm usque ad 60 mm altis.

Stipite glabro, carnoso, fragile, flexuoso, cylindraceo saepe compresso et contorto, basi albo vel albo-purpurascente, sursum vivide carmineo vel purpureo, capitulo concolore, 10-25 mm usque ad 40 mm alto, 1,5-2 mm crasso.

Capitulo terminale, cylindrico plus minusve clavato sed apice obtuso-rotundato et fertile, saepe lateraliter irregulariterque déformato et pulvinato, a stipite plus minusve distincto et basi oblique inserto, intus carnoso et vivide carmineo, extus plus minusve tomentoso vivide carmineo et purpureo-punctato, peritheciorum ostiolis leniter scabro, 5-25 mm alto et 2-2,5 mm crasso.

Peritheciis immersis, apice vix prominulis, peridio appresso e hyphis laxe percursis carmineis vel purpureis composito usque ad apice papillato tectis, elongato-ovoideis vel claviformibus, colle brevibus et strictis, parietibus vivide purpureis, intus hyalinis, 260-360 (320) μ altis et 100-180 (135) μ crassis.

Ascis hyalinis, cylindraceis, non vel breviter pedicellatis, capitatis, octosporidiis, 150-250 μ longis et 4-5 μ crassis.

Sporidiis hyalinis, filiformibus, flexuosis, apud ascorum longitudine, mutliseptatis, in articulos cylindraceos, apicibus truncatos, 7-12 μ longos et 1-1,5 μ crassos secedentibus.

Le spécimen type porte le n° 633 de la collection J. Moureau déposée dans l'Herbarium du Centre de Recherche de l'Institut pour la Recherche Scientifique en Afrique Centrale, à Mabali (Bikoro) Province de l'Equateur, République du Congo (Léopoldville).

C. vinosa Mour. est une espèce très voisine de *C. pruinosa* Petch et de *C. coccinea* Penzig et Saccardo (27).

Elle se distingue de *C. pruinosa* Petch (28) par la texture de sa clavule et sa teinte générale pourprée, par l'abondance du mycélium superficiel, sa consistance membraneuse, et sa teinte rosée ou pourprée, par la forme et la taille des périthèces qui par ailleurs sont beaucoup moins saillants, par la forme et la taille des asques et par le fait que, très fragile et putrescible, la clavule vire entièrement au violet en vieillissant.

Elle diffère de *C. coccinea* Penzig et Sacc. par sa taille considérablement plus grande, sa fragilité et sa putrescibilité, par la teinte du tissu superficiel du stroma qui est pourpre chez *C. vinosa* et blanc rosé chez *C. coccinea* et par la taille nettement plus grande des segments de spore.

11. Cordyceps (Eucordyceps) heteropoda Y. Kobayasi (8)

Planches 3 et 5, fig. 11.

Nous avons récolté cette espèce en très nombreux exemplaires sur une surface restreinte, dans une galerie forestière du Haut-Lomami à Kaniama (altitude 850 m) à la limite du Katanga et du Kasaï, en décembre 1950. Nous l'avons retrouvée, en janvier 1951, en bordure de la route qui traverse un lambeau de forêt tropophylle entre Luebo et Tshikapa et en décembre 1956 dans la forêt équatoriale de terre ferme à Mabali (Lac Tumba). Dans chaque cas, elle poussait sur le cadavre de la nymphe d'une petite cigale, logé dans sa galerie ascendante, dans un sol plus ou moins argileux, et à 2 ou 3 cm sous la surface.

Les clavules sont généralement solitaires mais il arrive qu'il s'en forme deux sur le même hôte. Elles naissent d'un mycélium superficiel blanc, membraneux, enrobant partiellement le cadavre de la nymphe et comblant le sommet de la galerie. La clavule est nettement capitée et émerge au-dessus de la surface du sol sur une hauteur de 2 à 4 cm. Elle mesure en tout 30 à 60 mm de haut et sa teinte générale est brun rosé.

Le stipe est charnu, ferme, rigide, cylindrique, brun rosé, pelucheux squameux, et intérieurement blanc dans sa portion exposée à l'air libre. Il est flexueux, tortueux, aminci, parfois aplati et blanc rosé dans sa portion souterraine. Il est couvert, au-dessus du sol, d'un revêtement superficiel fibrilleux brun rouge qui s'écaille à proximité du capitule et lui donne un aspect pelucheux. Entre les écailles pelucheuses gris brunâtre du sommet du stipe, apparaît un tomentum ras brun rosé. Le stipe naît de la partie postérieure de la tête de l'hôte. Il mesure en tout 25 à 50 mm de long sur 2 à 2,5 mm de section.

Le capitule est nettement distinct du stipe. Il est le plus souvent sphérique mais parfois il prend la forme d'une massue. Il est terminal mais son insertion sur le stipe est oblique et fendue en V renversé. Sur les capitules clavés, cette fente se prolonge vers le haut par un sillon irrégulier, festonné par des bourrelets d'importance variable. Il est, au début, couvert d'un tissu fibrilleux, apprimé, gris brun qui se déchire par la suite et est analogue au revêtement squameux du sommet du stipe. Il mesure 4,5 à 6 mm de diamètre quand il est sphérique. Il atteint 6 à 8 mm de haut sur 4,5 à 6 mm de diamètre quand il est clavé. Sa teinte générale est brun rougeâtre. Il est donc concolore à la portion aérienne du stipe mais légèrement plus foncé. Il est imperceptible

tiblement verruqueux et ponctué d'ambre grisâtre à maturité par suite des saillies correspondant à l'ostiole des nombreux périthèces.

Les périthèces sont immergés totalement dans un tissu compact, blanchâtre, formé d'hyphes enchevêtrées, à parois épaisses et brun jaunâtre plus serrées et plus colorées à la surface du capitule où elles constituent le revêtement fibrilleux décrit plus haut. Les périthèces forment des renflements sous ce revêtement que seul leur ostiole perce quand ils sont arrivés à maturité complète. Il n'existe donc pas de cuticule différenciée. Les périthèces ont la forme de poire ou de bouteille. Leur col est assez court (50 à 100 μ), brusquement et fortement rétréci (8 à 15 μ de diam.). Ils mesurent 550 à 770 μ de long sur 220 à 330 μ de diamètre.

Les asques sont cylindriques, coiffés d'un capuchon globuleux bien distinct et atténués à la base en un pédicelle assez long. Ils mesurent 300 à 450 μ de long sur 6 à 8 μ de diamètre.

Les spores sont filiformes, flexueuses, de 50 à 100 μ plus courtes que l'asque dont elles sortent, et de 1 à 2 μ d'épaisseur. Elles sont multiseptées et se scindent aisément en segments bacillaires à extrémités tronquées, de 8 à 12 μ de long.

Par tous leurs caractères macroscopiques (sauf leur taille plus variable), nos spécimens sont identiques à ceux que décrit Y. Kobayasi (**8**). La taille et la forme des périthèces est la même dans les deux cas. Les dimensions des spores et des segments de spore sont légèrement plus grandes. Kobayasi signale que les tissus du capitule sont formés d'hyphes qui s'orientent parallèlement entre elles et perpendiculairement à la surface du stroma. Effectivement, le tissu superficiel du capitule est nettement plus serré et plus compact que le tissu interne, mais il n'existe cependant pas de cuticule différenciée.

Cette espèce est très voisine de *C. gracilis* (Grev.) Mont. et Dur., dont J. Favre donne une description très complète (**4**). Les caractères macroscopiques et la texture du capitule sont identiques mais les dimensions des périthèces, des asques et des spores sont beaucoup plus grandes chez *C. gracilis* et les segments de spore plus petits. De plus *C. gracilis* pousse sur chenille.

12. Cordyceps (Eucordyceps) irangiensis (sp. nov.)

Planches 3 et 5, fig. 12.

Cette espèce a été récoltée en de très nombreux exemplaires sur la litière trempée d'eau de la forêt de montagne occupant une crête du versant occidental du Graben, près d'Irangi (Kivu, alt. 950 m). Elle fut récoltée antérieurement (août 1947), mais en un seul exemplaire, en forêt guinéenne, à Yangambi (alt. 450 m). Elle pousse sur diverses espèces de fourmis du genre *Camponotus*.

La clavule est généralement solitaire bien que certains hôtes en portent parfois deux bien distinctes. Elle émerge à la face ventrale du cadavre de la fourmi de l'articulation de la tête avec le thorax. Il n'y a pas, à proprement parler de mycélium superficiel mais, dans certains cas, le sclérote interne déborde à l'extérieur en formant de minces bourrelets compacts, blanc sale, ocrés ou fauves, sur la suture des segments de l'abdomen et au niveau de l'articulation des pattes sur le thorax.

Le stipe est grêle, filiforme, tortueux d'aspect cartilagineux et luisant. Il est ridé longitudinalement et brun ou brun rougeâtre à la base et jusqu'à mi-hauteur. Il pâlit insensiblement vers le haut, passe à l'ocre ou au jaune d'or et devient lisse à proximité du capitule. Sa taille, comme celle de la clavule tout entière, varie selon le volume de l'hôte et les conditions écologiques. Elle va de 10 mm à 50 mm de haut sur 0,2 à 0,5 mm de section.

Le capitule est terminal, nettement distinct du stipe. Il est ovoïde ou fusiforme avec un sommet plus ou moins pointu. Sa teinte est celle du sommet du stipe c'est-à-dire jaune d'or ou ocre pâle. Sa surface est très finement aspérulée par l'ostiole papillé des périthèces qui forment sous son revêtement superficiel des boursouflures longitudinales plus ou moins accentuées selon le degré de maturité ou l'état de dessèchement du spécimen. Par temps sec, elles sont très marquées et l'ostiole saillant prend une teinte ocre. A l'état jeune ou par temps humide, le capitule est lisse et luisant. Il mesure de 1,5 à 4 mm de haut sur 0,5 à 2 mm de section. Il possède une cuticule continue très nettement différenciée, de 15 à 25 μ d'épaisseur, constituée d'une ou deux couches de cellules courtes, presque cubiques, de 12 $\times$ 10 μ à parois épaisses colorées en jaune ocre. Ces cellules semblent faire partie d'hyphes parallèles, très serrées les unes contre les autres et orientées tangentiellement à la surface du capitule. Cette cuticule bien différenciée couvre un tissu interne

formé par des hyphes entrelacées à cellules relativement courtes hyalines et assez lâches en profondeur, serrées, colorées en ocre vers la surface. C'est au sein de ce tissu que se forment les périthèces. Le capitule possèse en outre un tissu axial distinct, confluent au stipe, assez compact et formé d'hyphes hyalines parallèles entre elles.

Les périthèces sont complètement immergés, même à maturité complète, l'ostiole seul faisant saillie à l'air libre. Ils sont insérés en une seule couche, quasi tangentiellement à la surface du capitule dans un tissu blanchâtre assez lâche couvert par la cuticule ocrée continue. Ce tissu interne s'affaisse par temps sec de sorte que la cuticule épouse la forme des périthèces en les moulant. Les périthèces ont la forme de massues ou de poires allongées, avec un col généralement long et recourbé vers la surface du capitule. L'ostiole repousse la cuticule mais ne la perce que quand le périthèce est arrivé à maturité complète. Ils ont une paroi très nettement différenciée, épaisse de 15 à 20 μ constituée de cellules hyalines, parallélipipédiques à membrane épaisse qui lui donnent un aspect sclérenchymateux. Ils sont de taille très variables et mesurent de 600 à 1.000 μ de haut sur 180 à 350 μ de diamètre maximum.

Les asques sont octosporés, cylindriques, surmontés d'un capuchon hyalin plus ou moins pointu et atténués à la base en un pédicelle filiforme de 20 à 50 μ de long. Ils mesurent 500 à 800 μ de long sur 6 à 8 μ d'épaisseur.

Les spores sont filiformes, très flexueuses, hyalines et multiseptées. Elles sont de 20 à 50 μ plus courtes que l'asque dont elles sortent et leur épaisseur varie de 1 à 1,5 μ. Elles se scindent aisément, après leur libération, en segments monocellulaires fusiformes ou plus ou moins cylindriques, à extrémités aiguës, de 10 à 12 μ de long.

Nos spécimens ressemblent à la fois à *C. sphecocephala* (Klotzsch) Berk. et Curt. (in Mains **23**), à *C. myrmecophila* Ces. (in Mains **23**) et à *C. formicarum* Kobayasi (**7** et **8**).

Ils se distinguent cependant très nettement de ces trois espèces par leur cuticule à hyphes tangentielles et colorées et surtout par la structure pseudosclérenchymateuse des parois des périthèces.

Ces deux caractères distinctifs justifient la création d'une espèce nouvelle que nous désignons sous le nom de *Cordyceps (Eucordyceps) irangiensis* J. Moureau et dont voici la diagnose latine :

Cordyceps (Eucordyceps) irangiensis sp. nov.

Stromatibus solitariis, raro duis, e parte ventrale thoracis formicarum (Camponotinae) prorumpentibus. Mycelio superficiale

nullo vel inter abdominis articulos crustuliniforme et albo-ochraceo erumpente.

Stipite simplice, cylindrico, filiforme, contorto, rigido, fibro-carnoso et lucido, basi rufo-brunneo, sursum luteo-ochraceo vel aureo, intus albido, 10-50 mm alto, 0,2-0,5 mm crasso.

Capitulo terminale a stipite distincto, ovoideo vel fusiforme, apice acutiusculo, primo laeve et viscido, deinde tuberculato, peritheciorum ostiolis prorumpentibus asperato et sicco, extus luteo-ochraceo vel aureo, textu albido intus molle extus compactiore e hyphis hyalinis percursis composito sed cum columella axillare rigida, peridio pseudoparenchymatico ochraceo tecto. Peridio 15-25 μ crasso ex una vel duis hypharum stratis composito. Peridii hyphis parallelibus et longitudinaliter ordinatis e cellulis oblongis vel cubicis, crassiparietalibus, luteo-ochraceis, 12 × 10 μ compositis. Capitulo 1,5-4 mm alto et 0,5-2mm crasso.

Peritheciis sub capituli peridio et in textu albido oblique et totaliter immersis, ampullaceis cum colle elongato et externe curvato, ostiolis vix prominulentibus et cum peridio 15-20 μ crasso, pseudosclerenchymatico e cellulis oblongis crassiparietalibus composito, 600-1.000 μ altis et 180-350 μ crassis.

Ascis cylindraceis, octosporidiis, cum capite hemisphaerica vel acutiuscula et basi pedicello filiforme 20-50 μ longo attenuatis, 500-900 μ longis et 6-8 μ crassis.

Sporidiis filiformibus, flexuosis, multiseptatis, 450-880 μ longis, 1-1,5 μ crassis, in articulos fusiformes aut plus minusve cylindricos apicicibus acutos, 10-12 μ longos secedentibus.

Le spécimen-type a été déposé dans l'Herbarium du Centre de Recherches de Mabali (Lac Tumba) de l'Institut pour la Recherche Scientifique en Afrique Centrale sous le n° 599 de la Collection J. Moureau.

CONCLUSION

Ainsi se termine, par la force des circonstances, une étude commencée en 1940 sous les auspices de l'Institut pour l'Etude Agronomique du Congo (INEAC) et poursuivie sous les auspices de l'Institut pour la Recherche Scientifique en Afrique Centrale (IRSAC) jusqu'en juillet 1960.

Le nombre des espèces entomophytes du genre Cordyceps récoltées au Congo et décrites d'une manière détaillée, s'élève actuellement à 36.

Il y a lieu d'ajouter à cette liste trois espèces que nous avons étudiées à un stade de développement malheureusement insuffisant pour en donner une description détaillée complète.

Ce sont :

C. (Eucordyceps) dipterigena Berk. et Br. (in Massee **24**), récolté en deux exemplaires, sur mouches, à Bambesa (Uele) le 22 juillet 1942 et le 22 avril 1944. Le premier spécimen était incomplètement mûr mais possédait une clavule typique parfaitement identifiable. Le second était stérile et aberrant. Il était infecté par un phycomycète hyperparasite indéterminé.

C. (Eucordyceps) corallomyces Möller (**25**), récolté en un seul exemplaire, sur larve de coléoptère, à Bambesa également, le 4 avril 1942. La clavule était typique mais ni les asques ni les spores n'étaient mûrs.

C. (Ophiocordyceps) unilateralis (Tul.) Petch (**29**), récolté incomplètement mûr, sur fourmi, à Yangambi, en 1948, par le R. P. Raigner.

Le genre *Cordyceps* est ainsi représenté au Congo par les 39 espèces entomophytes suivantes :

1. *C. (Torrubiella) carnata* J. Moureau (**26**).
2. *C. (Torrubiella) arachnophila* (Johnston) var. *pulchra* Mains (**22**).
3. *C. (Eucordyceps tuberculata* (Leb.) Maire (in Petch **30**).
4. *C. (Eucordyceps) filiformis* J. Moureau (**26**).
5. *C. (Eucordyceps) crinalis* (Ellis et Everhart) (**3**).
6. *C. (Eucordyceps) deflectens* Penzig et Saccardo (**27**).

7. *C. (Eucordyceps) engleriana* P. Hennings (in Petch **34**).
8. *C. (Eucordyceps) falcata* Berk. (in Petch **28**).
9. *C. (Eucordyceps) corallomyces* Möller (**25**).
10. *C. (Eucordyceps) taylori* (Berk.) Saccardo (**38**).
11. *C. (Eucordyceps) truncata* J. Moureau (**26**).
12. C. *(Eucordyceps) variabilis* Petch (**35**) non Mains (**23**).
13. *C. (Eucordyceps) aurea* J. Moureau (**26**).
14. *C. (Eucordyceps) typhulaeformis* (Berk. et Cooke) (Petch **32**).
15. *C. (Eucordyceps) takaomontana* Yakusiji *et* Kumazawa (**8**).
16. *C. (Eucordyceps) gemella* J. Moureau nom. nov.
17. *C. (Eucordyceps) rubripunctata* J. Moureau (**26**).
18. *C. (Eucordyceps) coccinea* Penzig et Saccardo (**27**).
19. *C. (Eucordyceps) variegata* J. Moureau (**26**).
20. *C. (Eucordyceps) miniata* J. Moureau sp. nov.
21. *C. (Eucordyceps) cinnabarina* Petch (**33**).
22. *C. (Eucordyceps) militaris* Linne ex Fries (in Petch **32**) var. *sphaerocephala* Kunz et Schm.
23. *C. (Eucordyceps) pseudo-insignis* J. Moureau (**26**).
24. *C. (Eucordyceps) pruinosa* Petch (**28**).
25. *C. (Eucordyceps) vinosa* J. Moureau sp. nov.
26. *C. (Eucordyceps) uleana* P. Hennings (**6**).
27. *C. (Eucordyceps) velutipes* Massee (**24**).
28. *C. (Eucordyceps) obtusa* Penzig et Saccardo (**27**).
29. *C. (Eucordyceps) heteropoda* Kobayasi (**8**).
30. *C. (Eucordyceps) lutea* J. Moureau (**26**).
31. *C. (Eucordyceps) dipterigena* Berk. et Br. (in Massee **24**).
32. *C. (Eucordyceps) sphecocephala* (Klotzsch) Berk. et Curt. (in Petch **32**).
33. *C. (Eucordyceps) irangiensis* J. Moureau sp. nov.
34. *C. (Eucordyceps) bicephala* Berk. (in Moureau **26**).
35. *C. (Eucordyceps) bicephala* Berk. subsp. *nutans* (Pat.) Moureau (**26**).
36. *C. (Eucordyceps) bicephala* Berk. subsp. *curculionum* (Tul.) Moureau (**26**).
37. *C. (Eucordyceps) lilacina* J. Moureau (**26**).
38. *C. (Eucordyceps) larvicola* Quelet (**37**).
39. *C. (Ophiocordyceps) unilateralis* (Tul.) Petch. (**29**).

Cette liste est très probablement encore incomplète et nous sommes convaincus qu'il reste beaucoup de découvertes à faire dans ce domaine, dans les forêts et les savanes du Congo.

OUVRAGES CONSULTES

1. Berkeley, M. J., Some entomogenous Sphaeriae, *Journ. Proceed. Linnean Soc.*, **1**, p. 157, 1857.
2. Cooke, Notes on Hypocraceae, *Grevillea*, **12**, p. 78, 1883-84.
3. Ellis, J. B. and Everhart, B. M., North American Pyrenomycetes, Newfield N. J., 1892.
4. Favre, J., Cordyceps gracilis (Grev.) Mont. et Dur., *Schweizer. Zeitschr. für Pilzkunde*, **2**, p. 18, 1942.
5. Hendrickx, F., Sylloge Fungorum Congensium, *Publ. INEAC. Ser. Scient*, n° **19**.
6. Hennings, P., Fungi Amazonici II, *Hedwigia*, **36**, p. 190, 1897.
7. Kobayasi, Y., On the Genus Cordyceps and its allies parasitic to Hymenoptera in Japan, *Bull. Biogeogr. Soc. Japan*, **9** 17, p. 271, 1939.
8. Kobayasi, Y., The Genus Cordyceps and its allies, *Sci. Rep. Tokyo Bunrika Daigaku, Sect. B.* n° **84**, **5**, p. 53, 1941.
9. Kobayasi, Y., Several species of the genus Cordyceps and their conidial forms, *Journ. Jap. Bot.*, **24**/1-2, p. 176, 1949.
10. Lloyd, C. G., Additional Notes on Cordyceps, *Mycological Writings* n° **5**, p. 591, 1916.
11. Lloyd, C. G., Additionnal notes on Cordyceps, *Mycological Writings* n° **6**, p. 911, 1920.
12. Mains, E. B., The Genera Cordyceps and Ophiocordyceps in Michigan, *Proceed. Amer. Philosoph. Soc.*, **74**/4, p. 263, *1934*.
13. Mains, E. B., A new species of Cordyceps with notes concerning other species, *Mycologia*, **29**, p. 673, 1937.
14. Mains, E. B., Cordyceps from the Mountains of North Carolina and Tennessee, *Journ. Elisha Mitchell Scient. Soc.*, **55**/1, p. 117, 1939.
15. Mains, E. B., Cordyceps species from British Honduras, *Mycologia*, **32**/1., p. 15, 1940.
16. Mains, E. B., Species of Cordyceps, *Mycologia*, **32**/3, p. 310, 1940.
17. Mains, E. B., Cordyceps stylophora and Cordyceps Ravenelii, *Mycologia*, **32**/6, p. 611, 1941.
18. Mains, E. B., New and interesting species of Cordyceps, *Mycologia*, **39**/5. p. 535, 1947.
19. Mains, E. B., Entomogenous Fungi, *Mycologia*, **40**/4, p. 402, 1948.
20. Mains, E. B., Cordyceps bicephala Berk. and C. australis (Spec.) Sacc., *Bull. Torrey Bot. Club*, **76**/1, p. 24, 1949.

21. Mains, E. B., New Species of Torrubiella, Hirsutella and Gibellula, *Mycologia*, 41/3, 1949.

22. Mains, E. B., The genus Gibellula on spiders in North America, *Mycologia*, 42/2, p. 306, 1950.

23. Mains, E. B., North American Entomogenous species of Cordyceps, *Mycologia*, 50/2, p. 169, 198.

24. Massee, Revision of the genus Cordyceps, *Annals of Bot.*, 9, p. 33, 1895.

25. Möller, Phycomyceten und Ascomyceten aus Brasilien, Fischer, Iena, 1901.

26. Moureau, J., Cordyceps du Congo Belge, *Inst. Nat. Col. Belg.*, Mémoire in 4°, 7/5, 1949.

27. Penzig and Saccardo, Icones Selectae Fungorum Javanicorum, 1904.

28. Petch, T., Some Ceylon Cordyceps, *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 10/1-2, p. 28, 1924.

29. Petch, T., Notes on Entomogenous Fungi, *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 16/1, p. 55, 1931.

30. Petch, T., Notes on Entomogenous Fungi, *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 16, p. 209, 1932.

31. Petch, T., Gibellula, *Annales Mycolog.*, 30, p. 386, 1932.

32. Petch, T., Notes on Entomogenous Fungi, *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 18/1, 1933.

33. Petch, T., Entomogenous Fungi from Madagascar, *Ann. Cryptog. Exot.*, 6, p. 230, 1933.

45. Petch, T., Notes on Entomogenous Fungi, *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 19/3, 1935.

35. Petch, T., Notes on Entomogenous Fungi, *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 21, p. 37, 1937.

36. Petch, T., Notes on Entomogenous Fungi, *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 23/2, 1939.

37. Quelet, L., Champignons du Jura et des Vosges, 6e supplément, *Bull. Soc. Bot. France*, 25, 1878.

38. Saccardo, Sylloge Fungorum, 2; 1883 et suppl. 9 (1891).

39. Spegazzini, C., Fungi Puiggariana, *Bol. Acad. Nac. Ci. Cordoba*, 11, 1889.

Mémoire rédigé à l'Université de Liège
Institut de Botannique, Dir. R. Bouillenne
le 7 février 1961.

PLANCHES

Les aquarelles reproduites dans les planches I à III sont l'œuvre de Simone Lacquemant, qui les a réalisées d'après des exemplaires frais.

Les grandissements respectifs sont mesurables d'après les échelles dessinées à côté de chacune des figures.

PLANCHE 1

1. **C. (Torrubiella) arachnophila** Johnston **var pulchra** Mains.
   a : aspect général; b : détail d'un stroma.

2. **C. (Eucordyceps) crinalis** Ellis et Everhart.
   a : forme typique; b : forme rappelant *C. ainictos* Möller; c : sommet d'un stroma.

3. **C. (Eucordyceps) deflectens** Penzig et Saccardo.
   a : aspect général; b : capitule; c : sommet de la clavule.

4. **C. (Eucordyceps) engleriana** P. Hennings.
   a : aspect général; b : sommet d'un stroma.

1a
1b
0 1 2 mm
2a
2b
0 5 10 mm
2c
0 1 2 mm
3a
0 5 10 mm
3b
0 5 mm
3c
0 1 mm
4a
0 5 10 mm.
4b
0 1 mm

PLANCHE 2

5. **C. (Eucordyceps) variabilis** Petch.
   a : aspect général; b : détail du capitule.

6. **C. (Eucordyceps) takaomontana** Yakusiji et Kumazawa.
   a : aspect général; b : détail du capitule.

7. **C. (Eucordyceps) miniata** J. Moureau sp. nov.
   a : aspect général; b : détail du capitule.

8. **C. (Eucordyceps) cinnabarina** Petch.
   a : aspect général; b : détail de la portion fertile.

5a
0
5 mm
5b
0
1
2 mm
6a
0 5 10 mm
6b
0 1 2 mm
7a
0 5 10 mm
7b
0
5 mm
8a
0 5 10 mm
8b
0 1 2 mm

PLANCHE 3

9. **C. (Eucordyceps) pruinosa** Petch.
   a : aspect général; b : détail du capitule.

10. **C. (Eucordyceps) vinosa** J. Moureau sp. nov.
    a : aspect général; b : détail de la portion fertile d'une clavule.

11. **C. (Eucordyceps) heteropoda** Y. Kobayasi.
    a : aspect général: b et c : deux formes de capitule.

12. **C. (Eucordyceps) iragiensis** J. Moureau sp. nov.
    a : aspect d'un spécimen immature; b : d'un spécimen mûr; c : capitule d'un spécimen non mûr; d : capitule d'un spécimen mûr.

9a
9b
10a
10b
11a
11b
12a
12b
12c
12d
0 5 10 mm
0 1 2 mm
0 0.5 1 mm

PLANCHE 4

1. **C. (Torrubiella) arachnophila** Johnston **var. pulchra** Mains.
2. **C. (Eucordyceps) crinalis** Ellis et Everhart.
3. **C. (Eucordyceps) deflectens** Penzig et Saccardo.
4. **C. (Eucordyceps) engleriana** P. Hennings.
5. **C. (Eucordyceps) variabilis** Petch.
6. **C. (Eucordyceps) takaomontana** Yakusiji et Kumazawa.

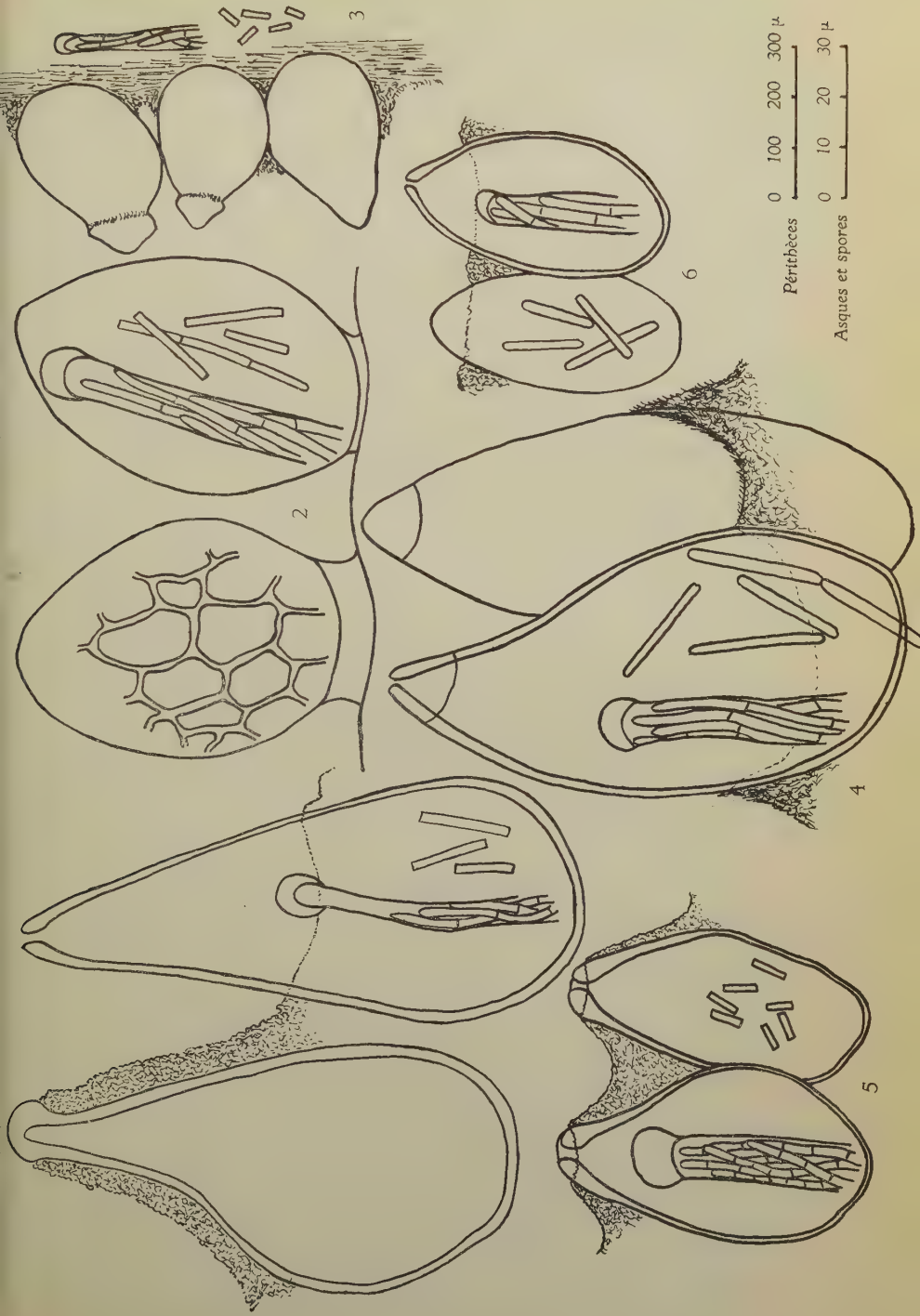

3
2
6
4
5
Périthèces
0 100 200 300 µ
Asques et spores
0 10 20 30 µ

PLANCHE 5

7. **C. (Eucordyceps) miniata** J. Moureau sp. nov.
   a : spécimen non mûr; b : spécimen mûr.
8. **C. (Eucordyceps) cinnabarina** Petch.
9. **C. (Eucordyceps) pruinosa** Pecth.
10. **C. (Eucordyceps) vinosa** J. Moureau sp. nov.
11. **C. (Eucordyceps) heteropoda** Y. Kobayasi.
12. **C. (Eucordyceps) irangiensis** J. Moureau sp. nov.
    a : spécimen non mûr; b : spécimen mûr.

a
7
b
8
9
10
11
12
a
b
Périthèces 0 100 200 300 µ
Asques et spores 0 10 20 30 µ

TABLE DES MATIERES

Introduction 5

Description des espèces

Cordyceps (Eucordyceps) gemella MOUREAU 6
Cordyceps (Torrubiella) arachnophila JOHNSTON var. *pulchra* MAINS 7
Cordyceps (Eucordyceps) crinalis ELLIS et EVERHART . . 9
Cordyceps (Eucordyceps) deflectens PENZIG et SACCARDO . 12
Cordyceps (Eucordyceps) engleriana P. HENNINGS . . . 15
Cordyceps (Eucordyceps) variabilis PETCH non MAINS . 17
Cordyceps (Eucordyceps) takaomontana YAKUSIJI et KUMAZAWA 19
Cordyceps (Eucordyceps) miniata MOUREAU sp. nov. . . 20
Cordyceps (Eucordyceps) cinnabarina PETCH 23
Cordyceps (Eucordyceps) pruinosa PETCH 25
Cordyceps (Eucordyceps) vinosa MOUREAU sp. nov. . . 26
Cordyceps (Eucordyceps) heteropoda Y. KOBAYASI. . . 30
Cordyceps (Eucordyceps) irangiensis MOUREAU sp. nov. . 32

Conclusions 35

Ouvrages consultés 37

Extrait du *Bulletin de l'Académie royale de Belgique* (Classe des Sciences)
Séance du samedi 30 juillet 1960

BOTANIQUE

L'aire de dispersion du genre Eminia Taub. (Munkoyo) et l'origine de son utilisation chez les Bantus.

par G. BERNIER (*)
Assistant à l'Institut de Botanique de l'Université de Liège.

Résumé. — L'aire de dispersion et les conditions macroécologiques du genre *Eminia* Taub. sont décrites : ce sont celles des forêts claires et savanes boisées ou herbeuses sud-orientales. De nombreuses populations humaines ont donc été en contact avec cette plante et ont pu découvrir ses propriétés amylolytiques.

Nous avons décrit, dans deux études antérieures (1) (3 et 6), l'utilisation des racines de *Munkoyo* (*Eminia* div. sp.) par les femmes haut-katangaises lors de la préparation d'une boisson fermentée. En bref, la fabrication débute par l'obtention, à partir de farine de Maïs, de Sorgho, d'Éleusine ou de Manioc, d'une pâte amylacée que l'on transvase ensuite dans de l'eau bouillante. On plonge alors dans la pâte encore chaude les racines d'*Eminia* désagrégées : immédiatement le brouet épais, en fait il s'agit d'un empois d'amidon, se liquéfie. La dernière étape de la fabrication est la fermentation alcoolique du breuvage par des levures.

Nous avons souligné la grande activité amylolytique de ces racines (3,5 kg suffisent pour le traitement de 130 litres de pâte), l'aspect spectaculaire de la liquéfaction et l'intérêt qu'il y aurait de connaître, d'un point de vue ethnologique, l'origine de cette utilisation : s'agit-il d'une coutume empruntée servilement à d'autres races ou d'une découverte propre aux Bantus ?

(*) Présenté par M. R. Bouillenne.

(1) Ces études ont été réalisées lors d'une mission F.U.L.R.E.A.C. subsidiée par le C.E.P.S.I.

Le problème est d'importance car l'utilisation des propriétés « fondantes » de la racine de *Munkoyo* dérive d'une observation certainement très ancienne et est issue d'un raisonnement un peu comparable à celui qui attribua des propriétés antibiotiques à un *Penicillium*.

D'autre part, la nature *enzymatique* du processus a été démontrée par M. et R. Bouillenne (4), qui ont de plus posé le problème de l'utilisation et de la culture industrielle de l'*Eminia*.

Il nous a paru intéressant de chercher à établir l'aire de dispersion du genre *Eminia* en Afrique, afin d'obtenir :

1. ses exigences macroécologiques ;

2. des indications sur les populations qui ont été en contact avec cette plante.

Ces deux points constituent la matière de la présente note.

Le genre *Eminia* Taub., de la famille des Papilionaceae et de la tribu des Phaseoleae, comporte 5 espèces toutes localisées en Afrique tropicale :

E. *antennulifera* (Bak.) Taub.
E. *Harmsiana* De Wild.
E. *Holubii* (Hemsl.) Taub.
E. *major* Harms
E. *polyadenia* Hauman

Trois de ces cinq espèces (E. *antennulifera*, E. *Holubii*, E. *polyadenia*) possèdent des propriétés amylolytiques certaines. Nous l'avons observé. La flore du Congo belge et du Ruanda-Urundi (5) signale, en outre, que les racines d'E. *Harmsiana* servent à préparer une bière. Quant à E. *major*, nous n'avons aucune indication sur ses propriétés.

Nous donnons ci-après la liste des lieux de récolte et des récolteurs pour les 5 espèces d'*Eminia*. Tous les échantillons se trouvant dans les herbiers des Institutions suivantes ont été répertoriés :

Royal Botanical Gardens de Kew,
British Museum de Londres,

Museum d'Histoire Naturelle de Paris,

Botanischer Garten und Museum de Berlin-Dalhem,

Jardin Botanique de l'État de Bruxelles (d'après la Flore du Congo belge et du Ruanda-Urundi (5),

National Botanic Gardens of South-Africa de Cape Town,

Division of Botany of the Department of Agricultural Technical Services de Pretoria,

Branch of Botany and Plant Pathology of the Federal Ministry of Agriculture de Salisbury.

Nous y avons ajouté les échantillons de notre propre herbier qui, bien que végétatifs, ont été déterminés par ressemblance avec les échantillons du Jardin Botanique de Bruxelles.

La carte annexée représente les stations de récolte de tous les spécimens que nous avons pu localiser avec précision. Thomson [9] signale E. *Holubii* à Serenje et à Lusaka en Rhodésie du Nord. Nous avons indiqué ces 2 stations sur la carte.

Liste des lieux de récolte et des récolteurs.

E. antennulifera (Bak.) Taub.

Tanganyika :

Morogoro (Eggeling, 6293 ; Vaughan, 2904).
Shinyanga (Bax, 143).
Mpwapwa (Hornby, 543).

Mozambique :

Tete (Barbosa et Carvalho, 3506).
Zambesia (Barbosa et Carvalho, 3785).
Entre Aguas Quentes et Morrumbala (Barbosa et Carvalho, 21128).

Nyassaland :

Lilongwe (Jackson, 600).
Mungazi (Kirk)
Zomba (Sharpe, 49).
Trichila Plain (Burtt Davy. 21956).
Shire Highlands (Buchanan, 254).
Nyandungwe (Meller — Type).

Katanga :

Pande (Bernier).

Rhodésie du Nord :

Abercorn (Richards, 1663 ; Greenway, 6196 ; Richards, 6422, 6057).
Mazabuka (Brenan et Greenway, 7796 ; Trapnell, 368, 1688 ; Veterinary officer, 368).
Luangwa (Fanshawe, 4534).
Chilanga (Sandwith, 170, 141).
Mumbwa (Macaulay, 1089).
Katete (Wright, 25 ; White, 2444).
Little Mkulungwe River (Rogers, 8359).
Fort Jameson (non communiqué).

Rhodésie du Sud :

Urungwe Reserve (Wild, 4158, 4153).
Salisbury (Craster, 8 ; Eyles, 848 ; Miller, 4452).
Lomagundi (Eyles, 2712).
Bulawayo (Chase, 1778).
Miami (Wild, 1295).
Mazoe Valley (Walters, 2277).

E. Harmsiana De Wild.

Katanga :

Tshinsenda (non communiqué).
Lukafu (Verdick, 528 — Type).

E. Holubii (Hemol.) Taub.

Katanga :

Pande (Bernier).

Rhodésie du Nord :

Mankoya (Trapnell, 1195).
Machile (Fanshawe, 4208).

Rhodésie du Sud :

Leshumo valley (Holub, 528-530 — Type).

E. major Harms

Tanganyika :

Lac Rukwa (Goetze, 1101 — Type).

Mozambique :

Vila Cabral (Torre, 268).
Chiuta (Barbosa et Carvalho, 3505).

Rhodésie du Sud :

Salisbury (non communiqué).

E. polyadenia Hauman

Katanga :

Mukuen (Schmitz, 4666).
Kasambi (Robyns, 2043 — Type).
Parc Upemba (Van Meel, 6822, Verheyen, 4051 — Type de la var. intermedia).
Tshakamalwa (Bernier).

On peut donner grosso modo les limites de l'étendue du genre :

— limite septentrionale : une ligne joignant Dar-es-Salam au Sud du lac Victoria puis au lac Upemba ;
— limite méridionale : le parallèle de 20° latitude Sud ;
— limite orientale : une ligne parallèle à la côte à quelques 50 à 100 km de distance ;
— limite occidentale : le méridien de 25° longitude Est.

Les *Eminia* couvrent donc plusieurs territoires : le Tanganyika, le Mozambique, le Nyassaland, le Katanga, la Rhodésie du Nord et la Rhodésie du Sud. Ils sont inconnus au Nord de l'Équateur, en Afrique du Sud — cfr notamment la flore de PHILLIPS [7] — et dans la forêt dense et humide.

Quelques *Eminia* indéterminés sont cependant signalés en Angola par le British Museum. Nous ne les avons pas repris dans la liste ni sur la carte, car ce point demande des éclaircissements.

L'espèce la plus ubiquiste est *antennulifera* rencontrée dans tous les territoires de l'aire. Les autres sont très nettement localisées : E. *Holubii* a une dispersion très occidentale de même que *E. polyadenia* et E. *Harmsiana* uniquement trouvés au Katanga. E. *major* a une aire orientale.

AUBREVILLE [2] signale que le genre *Eminia* est représenté dans les forêts sèches et les savanes boisées australes mais qu'il est absent des formations similaires boréales. Par ailleurs, l'aire de dispersion du genre concorde parfaitement avec celle du type de végétation nº 18 de la carte publiée par l'A. É. T. F. A. T. [1]. Ce type est la subdivision sud-orientale de l'aire des forêts claires, savanes (et steppes) boisées ou herbeuses.

Les caractéristiques climatiques d'une aire aussi vaste sont multiples. Il suffit pour s'en convaincre de parcourir la classification des climats écologiques forestiers dressée par AUBREVILLE [2].

La durée des saisons y est variable. Les pluies peuvent s'étendre sur 5-6 mois, de même que la saison sèche (Haut-Katanga) ; mais elles peuvent ne durer que 3-4 mois contre 6-8 mois de saison sèche (Mozambique-Rhodésie).

Les basses altitudes (Tanganyika) s'y rencontrent à côté des hauts-plateaux katangais. L'amplitude thermique peut être faible (Tanganyika) ou forte (Haut-Katanga, Rhodésie). Il semble cependant que l'on puisse caractériser tout ce territoire de la manière suivante :

— la saison sèche est rigoureuse et relativement fraîche ;
— les précipitations sont modérées (l'indice pluviométrique est assez faible) ;
— le déficit de saturation est moyen ;
— il y a possibilité de feu de brousse à chaque saison sèche ;
— la tension de la vapeur d'eau est moyenne.

Un fait particulier doit retenir notre attention en ce qui concerne l'étalement géographique du *Munkoyo*. Certaines stations de récolte au Tanganyika et au Mozambique sont assez proches de la côte orientale d'Afrique ; or celle-ci a été colonisée par les Arabes bien avant l'ère chrétienne [8]. Ceux-ci furent supplantés par les Grecs égyptiens du 1er siècle de notre ère puis ils réoccupèrent leurs stations commerciales côtières au 7e siècle [8]. Rien n'empêche de penser que ces colonisateurs étendaient leur action à l'intérieur du continent. On sait d'ailleurs qu'ils établissaient le contact avec les populations du Centre africain par l'intermédiaire de métis. Ces gens ont pu connaître le *Munkoyo* au même titre que les populations autochtones.

De ce qui précède, nous pouvons conclure que :

1. — de nombreuses populations ont été en contact avec le *Munkoyo*, notamment toutes celles qui occupèrent le pays avant l'arrivée des Semi-Bantus et des Bantus, ainsi que vraisemblablement les colonisateurs Arabes et Grecs ; l'origine « bantoue » de l'utilisation des racines d'*Eminia* n'est donc pas du tout certaine ; la tradition orale de certaines ethnies a peut-être gardé les traces de la découverte du *Munkoyo* mais nos rares investigations dans ce domaine sont restées infructueuses ;

2. — de toutes façons, les Semi-Bantus et les Bantus, originaires respectivement de l'Ouest (ancienne A. O. F.) et du Nord-Est (Sudan) [10], ignoraient l'existence des *Eminia* avant leurs migrations ;

3. — l'aire de dispersion et les conditions macroécologiques des *Eminia* sont celles des forêts claires et des savanes boisées ou herbeuses sud-orientales ; les conditions microécologiques propres aux *Eminia* restent à définir.

* * *

Nous remercions vivement les Directeurs de toutes les Institutions citées p. 698, pour la promptitude et l'amabilité avec lesquelles ils nous ont renseignés.

BIBLIOGRAPHIE

[1] A.É.T.F.A.T. : Carte de la Végétation de l'Afrique. Oxford University, Press, 1959.

[2] Aubreville A. : Climats, Forêts et Désertification de l'Afrique Tropicale. Paris, 1949.

[3] Bernier G. et Lambrechts A. : Étude sur les boissons fermentées indigènes du Katanga.
A.R.S.C., Mémoires in 8°, *IX*, 7, 1959.

[4] Bouillenne-Walrand M. et Bouillenne R. : Sur l'isolement et les propriétés d'un nouveau complexe amylolytique puissant, l'Éminiase, extrait de *Eminia* sp. A.R.S. d'Outre-Mer, *V*, 6, 1959.

[5] I.N.É.A.C. : Flore du Congo belge et du Ruanda-Urundi : Spermatophytes.
Bruxelles, 1948-1960.

[6] Lambrechts A. et Bernier G. : Enquête alimentaire et agricole dans les populations rurales du Haut-Katanga (1957-1958). Mémoire C.E.P.S.I. — En voie de publication.

[7] Phillips E. P. : The genera of south african flowering plants. Department of Agriculture. Division of Botany and Plant Pathology. Union of South Africa., 1951.

[8] Robert M. : Géologie et Géographie du Katanga.
Bruxelles, 1956.

[9] Thompson B. P. : Two studies in african nutrition.
Manchester University, Press, 1954.

[10] Van der Kerken G. : Les populations africaines du Congo belge et du Ruanda-Urundi.
Encyclopédie du Congo belge, Tome I., Bruxelles.

LEJEUNIA
REVUE DE BOTANIQUE

Nouvelle série N° 2 Novembre 1961

LES VÉGÉTAUX DANS LA VIE QUOTIDIENNE DES POPULATIONS RURALES DU HAUT KATANGA

par

Georges BERNIER
Assistant à l'Université de Liège

Les végétaux occupent une place essentielle dans la vie de l'homme. Directement ou indirectement, ils prennent une part importante dans ses activités et ses loisirs. Ce fait est beaucoup plus sensible à l'état « natif » c'est-à-dire chez des peuples primitifs.

Au cours d'une enquête alimentaire, agricole et socio-économique organisée par FULREAC et le CEPSI, nous avons eu l'occasion de vivre pendant un an (1957-1958) dans un village du milieu rural katangais. Nous avons rassemblé dans cet article les observations ethnobotaniques réalisées, pendant ce séjour, sur les populations Basanga et sur les ethnies voisines.

La fréquentation des villageois fait apparaître qu'ils possèdent une bonne connaissance des végétaux, surtout des végétaux utiles évidemment. Chacun connaît leurs noms et leurs propriétés. Chacun sait aussi où aller les trouver. Tous les cultivateurs savent déceler les bonnes terres par la présence de tel ou tel arbre ou de telle ou telle graminée. Enfin, n'importe quel homme peut s'aventurer pendant plusieurs jours dans la savane sans mourir de faim car il n'ignore pas quels sont parmi les végétaux qu'il rencontre, ceux qui sont comestibles et ceux qui ne le sont pas.

On verra par les énumérations qui suivent la grande variété existant dans les plantes utilisées et dans leurs emplois.

L'intérêt de la liste de plantes que nous présentons est de fixer de manière précise, à un moment donné et pour une ethnie déterminée, l'utilisation qui est faite des végétaux dans les divers domaines de l'activité humaine. Pour chaque plante, nous donnons les noms latin, français et kisanga * et des indications sommaires sur la partie utile et sur la façon dont on l'utilise.

*
* *

1 — ALIMENTATION

Manihot esculenta Krantz, manioc, tute.

C'est incontestablement l'aliment de base des populations haut-katangaises. Les tubercules du manioc, pelés et rouis pendant 3 jours dans de l'eau stagnante, sont séchés, découpés en cossettes et réduits en farine par pilonnage. La farine obtenue est à la base du bukari, pâte épaisse et chaude de farine et d'eau. Le bukari est le plat de consistance de tous les repas coutumiers katangais.

La farine de manioc sert aussi à préparer diverses semoules et la bière munkoyo dont nous reparlerons plus loin.

Les tubercules des variétés douces se consomment crus ou cuits simplement à l'eau.

Les feuilles, nommées matamba, broyées et cuites en épinard, constituent le légume préféré des villageois. Il faut noter ici que la ménagère, qui est toujours chargée de la récolte des légumes, choisit de façon régulière les plus jeunes feuilles et les pointes méristématiques. Cette habitude est très heureuse d'un point de vue alimentaire car elle fournit des légumes possédant une teneur en protéines élevée (5 à 8 gr % frais) par rapport aux légumes européens (1,5 à 2 gr % frais).

Zea mays L., maïs, mataba.

La farine extraite des grains décortiqués et pilés sert, comme la farine de manioc, à préparer le bukari, le munkoyo et des semoules.

Le grain tel quel est consommé cuit à l'eau salée ou grillé, rarement cru.

---

* Dialecte parlé au village de Pande situé à une cinquantaine de km au nord de Jadotville.

Le grain germé, les pelures du grain (parois du caryopse) entrent dans la préparation de la bière kibuku.

La tige sucrée (mois de février-mars) est grignotée. On en extrait parfois le jus pour en faire une limonade.

Sorghum sp., sorgho, mebele.

La farine de grains de sorgho décortiqués a les mêmes emplois que celle du maïs. Les grains germés accompagnent ceux du maïs dans le kibuku.

La tige crue est également mâchonnée.

Eleusine coracana (L.) Gärtn., éleusine, luku.

Par broyage entre deux pierres, les graines fournissent une farine servant à la fabrication d'un munkoyo et parfois du bukari.

Phaseolus vulgaris L., haricot, kunde.

Les graines se consomment généralement après une longue cuisson à l'eau. Parfois, on les grille.

Les feuilles cuites servent de légume sous le nom de sampu.

Voandzeia subterranea Thouars, voandzou, katoïo.

Les graines ont les mêmes emplois que celles du haricot.

Ipomaea batatas Poir., patate douce, kandolo.

Les tubercules peuvent être mangés crus mais le plus souvent ils sont cuits à l'eau. Parfois encore, ils sont découpés en lanières (kapesula) et séchés puis consommés après cuisson à l'eau.

Quelquefois, on retire une farine des tubercules pour servir d'élément de base à un munkoyo.

Les feuilles, préparées en légume cuit, sont très appréciées. On les appelle kalembula.

Dioscorea alata L., igname, bilungu.

Les tubercules sont cuits à l'eau pour la consommation.

Colocasia antiquorum L., taro, koko.

Les tubercules sont traités comme ceux de l'igname. Les feuilles cuites servent de légume.

Arachis hypogaea L., arachide, shama.

Les arachides en coques sont cuites à l'eau pour être consommées. Décortiquées, elles sont alors grillées. Généralement elles accompagnent les plats de légumes : dans ce cas, elles sont pilées finement.

Sesamum indicum L., sésame, bwengo.

Des graines, on extrait une huile de consommation.

Cucurbita div. sp. et *Cucumis* div. sp., courges, concombres, potirons, miungu, kinsenga.

Les fruits, cuits soit au sel, soit au sucre, servent couramment de grignotage entre les repas.

Les feuilles de *Cucurbita* sp., sous le nom de musoma, constituent un légume recherché lorsqu'elles sont cuites en épinard.

Solanum lycopersicum Müller, tomate, tomato.

La tomate cuite est un légume fréquemment rencontré dans le Haut-Katanga. Mais elle constitue rarement à elle seule un plat complet. Le plus souvent, elle accompagne d'autres légumes ou un poisson.

Il faut noter que les tomates sont toujours vertes, immatures au moment de la consommation.

Autres *Solanum* : *S. wildemanii* Dammer, matole, et *S. subsessile* De Wild., mutete.

Plusieurs espèces de *Solanum* sont comprises sous le nom de matole, l'une d'elles est *S. wildemanii* et une autre est *S. nodiflorum* Jacq.

Les fruits de ces Solanacées sont consommés après cuisson; toujours ils sont cueillis à l'état immature.

Capsicum frutescens L., pili-pili.

La cuisine katangaise utilise abondamment les fruits du pili-pili.

Allium cepa L., oignon, kaniense.

Un autre ingrédient courant est constitué par les feuilles d'oignon qui sont ajoutées aux autres légumes ou aux poissons.

Autres légumes verts

Les feuilles des plantes suivantes sont utilisées comme légume, toujours après cuisson :

Solanum subsessile De Wild., mutete
Solanum nigrum L., musebo
Amaranthus hybridus L., libondwe
Amaranthus hybridus L., ssp. *cruentus* (L.) Thell., libondwe
Gynandropsis gynandra (L.) Briq., lubanga
Hibiscus sabdariffa L., ngaï-ngaï
Bidens pilosa L., sokontwe.

Les légumes *Amaranthus, Hibiscus, Gynandropsis* sont cités par Nicholls dans son manuel de nutrition tropicale (13), par Irvine (11) et par Schnell (16).

Elaeis guineensis L., palmier à huile, mukoma.

Dans le Haut-Katanga, il existe peu de palmiers *Elaeis*. Nous avons cependant observé quelques rares consommations de « cœurs de palmier ». Ces derniers ne sont autres que des bourgeons terminaux coupés en rondelles, cuits à l'eau puis passés à l'huile bouillante et salée. Ce met est encore appelé « chou palmiste ».

Dans la région à palmeraies de Kamina-Kabongo, nous avons été témoin de la fabrication interdite de vin de palme à partir de palmiers abattus. Le bourgeon terminal, mis à nu et sectionné transversalement, laisse suinter la sève qui après fermentation devient le vin de palme.

Les ménagères de cette région extraient l'huile de palme à partir du péricarpe des fruits par un processus assez compliqué. Schématiquement, elles cuisent à l'eau les palmes ayant fermenté puis les soumettent au pilonnage et au pressage. Le liquide gras, tiré de la pulpe et mélangé à de l'eau, est émulsionné à l'aide d'un bâtonnet. La mousse ainsi constituée est seule récoltée et mise à chauffer. L'huile de palme se sépare rapidement d'un dépôt qui est éliminé.

De l'amande, on tire une autre huile de consommation. Des inflorescences mâles réduites en cendres, on tire un sel qui sert également à la consommation. La technique d'extraction est semblable à celle utilisée pour la préparation de nambwa p. 13 et ressemble à celle décrite dans Bervoets et Lassance (3) pour d'autres régions du Congo.

Saccharum officinarum L., canne à sucre, monge.

Les tiges pelées se mâchent crues en saison sèche.

Eminia antennulifera (Bak.) Taub., *E. polyadenia* Hauman, *E. holubii* (Hemsl.) Taub., munkoyo.

Les racines de ces 3 espèces ont la propriété d'hydrolyser extrêmement rapidement un empois d'amidon en maltose. Les villageois haut-

katangais s'en servent pour remplacer le maltage dans la fabrication de certaines bières. Une pâte épaisse et chaude de farine amylacée est transformée par les racines de munkoyo en un liquide légèrement sucré qui subit alors la fermentation alcoolique par diverses levures. On trouvera plus de détails au sujet des boissons fermentées dans Bernier et Lambrechts (2) et au sujet de munkoyo dans Bernier (1).

L'utilisation des racines de munkoyo dans la fabrication d'une bière a déjà été signalée par De Wildeman (5), par Thomson (19) et par la Flore du Congo Belge et du Ruanda-Urundi (10) mais sans aucune autre précision. Poot (14), en 1954, décrit de façon incorrecte la préparation du breuvage munkoyo, à partir des racines du même nom. Aucun de ces auteurs n'a réussi à interpréter correctement la propriété hydrolysante peu ordinaire que possèdent les racines d'*Eminia*.

Plantes à fruits comestibles

Nous ne citerons pas le bananier (dikonde) car, malgré la présence de quelques bananeraies, nous n'avons pas observé la consommation de ses fruits.

Mangifera indica L., manguier, mwembe.

Les mangues se mangent de fin novembre à mi-janvier. On peut parfois observer, au mois d'octobre, la consommation de fruits verts.

Les fruits se cueillent sur l'arbre à l'aide d'une longue fourche.

Parinari mobola Oliv., mupundu.

Les drupes mûres en septembre-octobre jonchent le sol. On les apprécie pour leur saveur astringente. On les pile aussi pour en obtenir une limonade. Les graines se consomment crues ou cuites à l'eau accompagnant alors la viande ou le poisson. On en extrairait une huile siccative (De Wildeman — 6).

Anisophyllea boehmii Engl., mufungo.

En octobre, les drupes mûres sont recherchées. On les mange telles quelles ou en limonade comme les précédentes. Elles font parfois l'objet d'un interdit pour la femme enceinte.

Aframomum stipulatum (Gagn.) K. Schum., matungulu.

Les baies souterraines d'*Aframomum* sont très appréciées en fin de saison sèche (juin à septembre) car elles sont très rafraîchissantes.

Morus indica L., dilubeni.

Le mûrier est cultivé dans les villages et ses fruits sont consommés.

Lannea edulis (Sond.) Engl., bukukute.

Drupes au début de la saison des pluies : octobre-novembre.

Ficus div. sp. dont *F. mucuso* Welw., kitabataba.

Fin de la saison sèche, début de la saison des pluies.

Coccinea engleri Gilg., lubolokakabwa.

On cueille les fruits, en janvier-février, au hasard des rencontres. Leur ressemblance avec la verge des petits singes est un sujet d'infinies plaisanteries.

Annona chrysophylla Boj., mulolo.

L'arille des graines est l'organe recherché pour la consommation.

Syzygium guineense (Willd) DC. var. *macrocarpum* Engl., musafwa.

Baies en octobre.

Cissus sp., muomba.

Baies en décembre.

Thunbergia affinis S. Moore, maluba a buki.

On suce le fond de la corolle pour en retirer un jus sucré.

Vitex cuneata Schum. et Thonn., mufutu.

Drupes en juin-juillet.

Parkia filicoidea Welw., mukungwa.

Les gousses tombent de l'arbre en décembre-janvier. On les recherche pour en déguster la chair rose à l'exclusion des graines.

Strychnos cocculoides Bak., kasongole.

Baies en septembre-octobre.

Uapaca sp., makusu; etc., etc.

La plupart de ces végétaux à fruits comestibles avaient déjà été signalés par différents auteurs. Lebrun (12) a indiqué la comestibilité des fruits de certains *Ficus*. Staner (18) cite, dans une étude fort inté-

ressante sur les plantes congolaises à fruits comestibles, *Parinari mobola*, *Morus indica*, *Syzygium guineense*, *Vitex cuneata*, *Parkia filicoidea* et *Strychnos cocculoides*. Il cite aussi des espèces d'*Aframomum*, de *Lannea* et de *Cissus* comestibles mais différentes des nôtres. Duvigneaud et Dewit (7), pour leur part, signalent la consommation des fruits d'*Anisophyllea boehmii*. Schnell (16) cite également des espèces comestibles d'*Aframomum*, de *Ficus*, de *Parkia*, de *Lannea*, de *Strychnos*, de *Cissus*, d'*Anisophyllea*, de *Vitex*, de *Parinari*.

Les Mycètes

Un certain nombre de champignons supérieurs (Basidiomycètes) sont récoltés en vue de la consommation. Nous avons relevé entre autres des Amanites, des Chanterelles, etc...

Les indigènes utilisent enfin les levures et champignons apparentés pour réaliser les fermentations alcooliques. L'intérieur des calebasses où se réalise le processus est tapissé d'une épaisse couche de levures que l'on n'enlève pas. Ceci permet d'obtenir des fermentations rapides et à peu près uniformes d'un brassage à l'autre. Nous avons isolé des bières munkoyo et kibutu 4 organismes : *Hansenula anomala* (Hansen) H. et P. Sydow, *Candida krusei* (Cast.) Berkhout, *Geotrichum candidum* Link et *Trichosporon cutaneum* (De Beurm., Gougerot et Vaucher) Ota.

Hormis le cas de la canne à sucre et des plantes à fruits comestibles, la consommation d'organes crus est extrêmement rare en milieu coutumier. Il est de règle que tous les aliments doivent être longuement cuits avant d'être ingérés et cette remarque s'applique aussi à l'alimentation d'origine animale.

La consommation de fruits crus est d'ailleurs d'observation peu courante. C'est à l'occasion d'une incursion en brousse, du retour des champs, etc., que le villageois récolte sur son passage les fruits mûrs rencontrés. Jamais nous n'avons observé de cueillette systématique sauf dans le cas des mangues et des fruits du *Parinari mobola*.

2 — AGRICULTURE

Les végétaux mis en culture sont essentiellement les mêmes que ceux cités dans la rubrique « Alimentation ». Chaque famille possède plusieurs champs : le champ de maïs-sorgho, le champ de manioc de l'année, les champs de manioc des deux années précédentes et éventuel-

lement quelques petits jardins de patates douces, d'ignames, de légumes, de tabac, de chanvre, etc.

Les tubercules du manioc, exigeant un sol meuble pour se développer, sont cultivés sur buttes de 1 mètre de hauteur. Bouturé en janvier, le manioc ne sera récolté que 2 ou 3 ans plus tard. La première année de culture, il est accompagné de haricots, de voandzou, d'arachides, quelquefois de maïs et de tomates. Par la suite, l'exubérance de sa végétation empêche toute culture intercalaire.

Le maïs et le sorgho sont semés en novembre-décembre, seuls ou en mélange, sur des buttes plus basses (40 à 50 cm de hauteur). La femme, qui est chargée des semailles, procède aussi à la récolte en avril-mai-juin. Les diverses cucurbitacées rampent sur le sol entre les buttes. Il faut noter qu'elles ont été semées préalablement au buttage aux endroits enrichis en cendres par le défrichement. On voit encore dans le champ de maïs-sorgho, des plants de tomate et de piment pili épars, des plages de patates douces, de sésame, des solanacées diverses, etc...

Dans certains villages, chaque famille possède encore plusieurs petits champs d'éleusine. Celle-ci se cultive sur terrain plat, riche en cendres et sans plantes intercalaires.

La culture des plantes occupe de nombreux mois de l'année tant en ce qui concerne l'homme que la femme. L'homme est déjà mis à contribution dès les mois de juin et juillet par la recherche de nouvelles terres arables et par leur défrichement. En septembre, il met le feu aux herbes desséchées qui couvrent ses divers champs. Dès les premières pluies d'octobre et jusqu'en janvier, hommes et femmes vont butter et biner leurs différents champs. A la femme est réservé le semis tandis que l'homme s'occupe du bouturage du manioc.

Enfin, lorsque les céréales sont mûres, les villageois doivent encore inlassablement surveiller leurs cultures contre les animaux prédateurs.

La dernière opération, la récolte, est réservée aux femmes.

Il faut encore signaler que certaines familles se sont spécialisées dans la culture maraîchère ou fruitière de plantes alimentaires européennes. Leurs produits sont écoulés dans les grandes villes; rarement on en soustrait une petite partie pour la consommation propre. C'est ce qui explique l'absence de légumes et fruits européens dans la liste des plantes alimentaires.

Retenons pour terminer l'utilisation très intéressante des terrains enrichis en cendres pour la culture de certaines plantes : éleusine, cucurbitacées, légumes. Mais c'est là un caractère général de l'agriculture tropicale primitive et non une caractéristique de la région (Schnell, 16).

3 — PÊCHE

La façon la plus répandue de pêcher est celle qui utilise la nasse. Celle-ci consiste en une sorte de panier à ouverture en entonnoir. Le poisson, une fois entré, ne peut plus en sortir. Le villageois, qui a l'habitude de placer ses nasses dans une petite rivière ou dans un petit canal d'irrigation, les fabrique généralement lui-même, à partir des feuilles du faux-dattier, *Phoenix reclinata* Jacq. Le nom kisanga de ces feuilles est lunkindu.

Un autre mode de pêche, plus rare celui-ci, est d'empoisonner le poisson des ruisseaux par les produits ichtyotoxiques contenus dans les feuilles de l'arbuste *Tephrosia vogelii* Hook nommé buba ou kansamba. Selon Grévisse (9), buba serait la dénomination du toxique et kansamba celle de l'arbuste. Cet arbuste est cultivé en bordure des champs. On trouvera dans Wilbaux (20) des détails et la bibliographie au sujet de *Tephrosia*.

4 — CHASSE

Le chasseur se sert aussi des végétaux pour fabriquer une multitude de pièges. Leur description serait fastidieuse. On trouvera dans Grévisse (9) une liste déjà longue et pourtant encore incomplète de divers types de pièges. Nous choisirons ici un exemple : celui du piège à taupe (fig. 1).

Le piège à taupe se fabrique dans des fragments de branches rectilignes dont on peut facilement détacher l'écorce par battage. On obtient ainsi un cylindre d'écorce dans lequel on perce un trou latéral. La corde *a* est tendue transversalement dans le cylindre, sort par le trou *t* et va s'attacher au bâton 1. Sur la tranche du cylindre, on trace une rainure et on y dispose une corde *b* arrangée en nœud coulant. L'autre extrémité de cette corde se rattache à la baguette flexible 4. Le cylindre tel quel est placé dans une galerie de taupe, l'ouverture à nœud coulant étant dirigée vers les parties profondes, l'autre ouverture est laissée ouverte à la lumière. Le système de bâtons 1, 2, 3 et 4 est adapté au-dessus du piège parmi les herbes et les brindilles. La taupe attirée par la lumière se heurte à la corde *a* qu'elle tâche de repousser. A un certain moment, la corde *a* trop tendue va attirer le bâton 1 qui, libérant le bâton 2, va provoquer la détente du bâton 4. Ce faisant, la corde *b* va se resserrer autour de la taupe qui ne pourra plus s'enfuir.

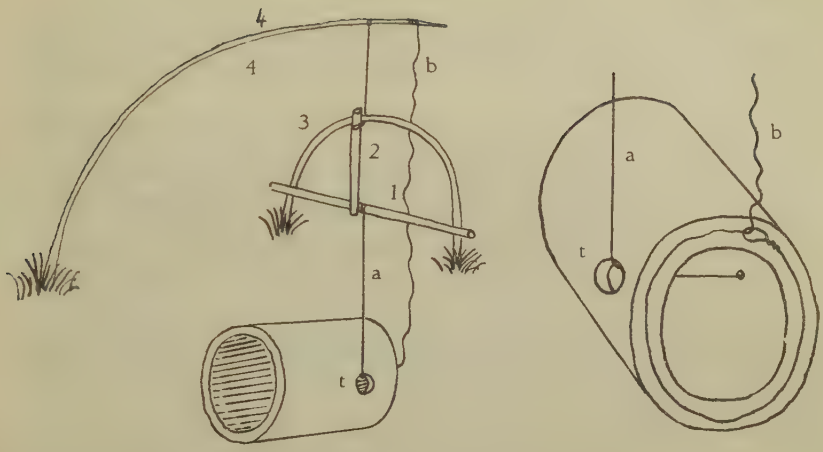


Figure 1

Le piège à taupe. A gauche, ensemble du montage.
A droite, détails du cylindre d'écorce. Explications dans le texte.

5 — CONSTRUCTION

Les matériaux de construction de la hutte familiale, des greniers, du poulailler sont encore, en grande majorité, tirés du règne végétal. Tel est le cas des bois constituant la charpente de toute construction, des cordes coutumières remplaçant les clous et des pailles qui tiennent lieu de toit.

Les cordes sont tirées de morceaux d'écorce longuement détrempés, découpés en lanières fines et attachés bouts à bouts. L'une des écorces utilisées est notamment celle du *Brachystegia spiciformis* Benth. (kaputu).

Les pailles servant de toit sont le plus souvent constituées des grands chaumes desséchés de graminées du genre *Andropogon*, notamment, *A. shirensis* Hochst. et surtout *A. gaianus* Kunth. var. *squamulatus* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf ou de genres voisins. Rarement, les villageois choisissent les chaumes d'*Imperata cylindrica* (L.) P. B. à cause de leur petite taille. C'est une fois de plus la femme qui est chargée de la récolte des pailles en fin de saison sèche mais c'est l'homme qui se réserve toutes les autres activités de construction.

6 — ARTISANAT

De multiples activités artisanales masculines s'occupent de tailler le bois pour en obtenir des outils, des mortiers, des pilons, des cuillers, des tambours, des statuettes.

Les femmes, de leur côté, se livrent à la confection de nattes, de tamis, de paniers à partir de fibres végétales qui leur sont fournies, le plus souvent, par les feuilles de diverses cypéracées, de *Phragmites* div. sp. et surtout par celles du faux-dattier, *Phoenix reclinata* Jacq.

Un grand nombre d'ustensiles de cuisine, bols, louches, touries destinées à recevoir de grandes quantités de bière, etc., ne sont rien d'autres que des fruits de la calebasse, *Lagenaria vulgaris* Ser., molwe en kisanga, aux formes variées, durcis par immersion prolongée et taillés de façon ad hoc.

7 — MÉDECINE

Il est bien connu que tous les peuples primitifs ont une bonne connaissance de la valeur médicinale des végétaux. L'arsenal des plantes à usage médical des populations africaines est vaste et est loin d'être complètement exploré. Cet aspect de l'utilisation des végétaux étant hors du cadre de notre enquête, nous ne l'avons abordé que fortuitement. Nous donnons ci-après quelques exemples.

Securidaca longepedunculata Fresen, muyeye.

Les racines de cet arbuste, pelées et réduites en bouillie, sont utilisées par les femmes qui veulent se suicider. Elles introduisent la bouillie dans le vagin, se maillottent avec un morceau d'étoffe et se couchent. Dans ces conditions, la mort s'ensuit assez rapidement. Robyns (15) et le R. P. de Sousberghe (17) avaient déjà signalé cet usage des racines de *Securidaca* chez les indigènes de Pweto et chez les Bapende du Kasaï. Nous l'avons retrouvé dans le Haut-Katanga où cette plante se nomme muyeye.

Ricinus communis L., mumono.

Les plantes de Ricin sont cultivées aux abords des villages dans de la gadoue. Les usages de l'huile de ricin sont identiques à ceux que nous connaissons. On s'en sert en outre pour soigner les morsures de serpent.

Aframomum stipulatum (Gagn.) K. Schum., matungulu.

Des fruits, que l'on consomme par ailleurs, on tire un « vin » qui sert de médicament contre la grippe.

Bauhinia petersiana Bolle, kifumbe.

On nous a affirmé, sans que nous ayons pu le vérifier, que la gousse possédait des propriétés abortives.

8 — LOISIRS

La plupart des jeux, des enfants comme des adultes, sont réalisés à partir de matériaux végétaux (fruits, graines, feuilles, etc.). Pour être complet, il faut encore citer le tabac (fuanka), un âcre tabac que l'on fume ou que l'on prise. Chacun en prépare en mélangeant les feuilles de *Nicotiana*, séchées et réduites en poudre, à un liquide épais et foncé, le nambwa. On obtient le nambwa en remplissant de cendres d'écorce une casserole percée de trous. De l'eau est mise à filtrer à travers la cendre et on recueille un liquide salé et brunâtre que l'on concentre par ébullition prolongée. L'écorce du *Brachystegia spiciformis* déjà citée est l'une des plus employées dans cette préparation. Enfin le chanvre, *Cannabis sativa* L. *var. indica* Lam., est fumé par quelques indigènes de la région.

Les pipes sont taillées dans des calebasses (*Lagenaria vulgaris* Ser.). C'est encore à l'aide de ces mêmes calebasses, que le Congolais de la brousse a pu se fabriquer bon nombre d'instruments de musique : mandoline, xylophone coutumier, etc.

9 — DIVERS

Nous ne parlerons pas des plantes ornementales des villages, *Jacaranda*, *Bougainvillea*, *Cassia*, etc., qui ont été plantées car les Européens et non par les autochtones. Ces derniers ne semblent pas posséder à ce sujet de goûts spéciaux.

Nous citerons seulement quelques emplois particuliers de certaines plantes.

Les spathes ou les rachis secs du maïs servent de papier hygiénique. Les deux servent encore à allumer le feu. On utilise à cette fin un briquet rudimentaire à silex.

Les spathes de maïs servent encore de matériel de bourrage pour les matelas.

Enfin, les tatouages corporels noirs et brillants dont se parent encore couramment les femmes sont obtenus par l'introduction d'un mélange de poudre de charbon de bois et d'huile dans des incisions cutanées.

⁂

La lecture des divers emplois des végétaux a dû convaincre le lecteur de l'importance des rapports homme-plantes dans les sociétés primitives. Comme nous l'indiquions au début de cet article, les végétaux sont la solution de toute une série de problèmes d'ordre domestique, alimentaire, médical, brassicole, etc. et nous sommes certains d'en avoir omis.

Pour terminer, nous voudrions insister sur la valeur des noms vernaculaires. Irvine (11) a déjà exposé les multiples raisons de leur intérêt et a suggéré l'établissement de listes des noms vernaculaires accompagnés des noms scientifiques correspondants. C'est pourquoi nous avons rassemblé à la fin de cet article les noms kisanga des végétaux utilisés par l'ethnie basanga et ses voisines. Il faut cependant remarquer que :

1° dans le cas des plantes utiles le nom vernaculaire désigne l'organe utilisé ou le produit qu'on en retire plutôt que la plante. Ainsi tute désigne le manioc-produit plutôt que le manioc-plante.

2° le même nom peut s'appliquer à diverses espèces différentes mais généralement l'indigène possède un nom par espèce ou même par variété. Ainsi munkoyo désigne les plantes du genre *Eminia* mais l'indigène distingue le munkoyo wa mulaba, le munkoyo wa kilunge, etc. De même, il existe un nom pour chaque variété de maïs, de manioc, etc. Il serait intéressant de comparer les critères utilisés par l'africain pour délimiter une espèce ou une variété aux critères employés par le botaniste.

3° les dialectes locaux, tel le kisanga, sont plus riches en noms de végétaux que les grands langages véhiculaires de l'Afrique, tel le kiswahili. Ces derniers, surtout utilisés dans les grands centres, perdent le contact avec le milieu rural et notamment avec la brousse.

L'intérêt des noms vernaculaires apparaîtra encore mieux lorsque le lecteur saura que le même nom « mupundu » désignant *Parinari mobola* et quelques autres *Parinari* se retrouve dans De Wildeman et Staner (4), dans De Wildeman (5-6), dans Staner (18), dans la

Flore du Congo Belge (10), dans Gillardin (8), dans Bernier et Lambrechts (2) et dans la liste des noms vernaculaires des végétaux katangais dressée par Lhoas.

Pour le chercheur travaillant sur le terrain, il est certain qu'une liste de noms vernaculaires est un guide utile et précieux.

Le séjour que nous avons effectué au Congo a été réalisé dans le cadre des recherches de FULREAC au Katanga. Toute notre gratitude va à cet organisme ainsi qu'au CEPSI d'Elisabethville qui a financé notre enquête.

Nous remercions aussi MM. G. Troupin de l'IRSAC et A. Schmitz de l'INEAC pour l'aide qu'ils nous ont apportée dans la détermination de certains spécimens botaniques.

La détermination des levures a été effectuée au Centraal-bureau voor Schimmelcultures-Baarn, grâce à un subside que nous a accordé le Centre National de Recherches Mycologiques dont nous remercions le Président, le Professeur R. Bouillenne.

LISTE DES NOMS VERNACULAIRES

Bilungu	*Dioscorea alata* L.	Dioscoreaceae
Buka	*Tephrosia vogelii* Hook.	Papilionaceae
Bukukute	*Lannea edulis* (Sond.) Engl.	Anacardiaceae
Bwengo	*Sesamum indicum* L.	Pedaliaceae
Dikonde	*Musa* sp.	Musaceae
Dilubeni	*Morus indica* L.	Moraceae
Fuanka	*Nicotiana tabacum* L.	Solanaceae
Kandolo	*Ipomaea batatas* Poir.	Convolvulaceae
Kaniense	*Allium cepa* L.	Liliaceae
Kansamba	*Tephrosia vogelii* Hook.	Papilionaceae
Kaputu	*Brachystegia spiciformis* Benth.	Caesalpiniaceae
Kasongole	*Strychnos cocculoides* Bak.	Loganiaceae
Katoïo	*Voandzeia subterranea* Thouars	Papilionaceae
Kifumbe	*Bauhinia petersiana* Bolle	Caesalpiniaceae
Kinsenga	*Cucumis* sp.	Cucurbitaceae
Kitabataba	*Ficus mucuso* Welw.	Moraceae
Koko	*Colocasia antiquorum* L.	Araceae
Kunde	*Phaseolus vulgaris* L.	Papilionaceae
Libondwe	*Amaranthus hybridus* L.	Amarantaceae
Lubanga	*Gynandropsis gynandra* (L.) Briq.	Capparidaceae
Lubolokakabua	*Coccinea engleri* Gilg.	Cucurbitaceae
Luku	*Eleusine coracana* (L.) Gärtn.	Gramineae

Lunkindu	*Phoenix reclinata* JACQ.	Palmae
Makusu	*Uapaca* sp.	Euphorbiaceae
Maluba a buki	*Thunbergia affinis* S. MOORE	Acanthaceae
Mataba	*Zea mays* L.	Gramineae
Matole	*Solanum* div. sp. dont *S. Wildemanii* DAMMER	Solanaceae
Matungulu	*Aframomum stipulatum* (GAGN.) K. SCHUM.	Zingiberaceae
Mebele	*Sorghum* sp.	Gramineae
Miungu	*Cucurbita* sp.	Cucurbitaceae
Molwe	*Lagenaria vulgaris* SER.	Cucurbitaceae
Monge	*Saccharum officinarum* L.	Gramineae
Muembe	*Mangifera indica* L.	Anacardiaceae
Mufungo	*Anisophyllea boehmii* ENGL.	Rhizophoraceae
Mufutu	*Vitex cuneata* SCHUM. et THONN.	Verbenaceae
Mukoma	*Elaeis guineensis* L.	Palmae
Mukungwa	*Parkia filicoidea* WELW.	Mimosaceae
Mulolo	*Annona chrysophylla* BOJ.	Annonaceae
Mumono	*Ricinus communis* L.	Euphorbiaceae
Munkoyo	*Eminia antennulifera* (BAK.) TAUB., *E. polyadenia* HAUMAN, *E. holubii* (HEMSL.) TAUB.	Papilionaceae
Muomba	*Cissus* sp.	Vitaceae
Mupundu	*Parinari mobola* OLIV.	Rosaceae
Musafwa	*Syzygium guineense* (WILLD) DC. var. *macrocarpum* ENGL.	Myrtaceae
Musebo	*Solanum nigrum* L.	Solanaceae
Mutete	*Solanum subsessile* DE WILD.	Solanaceae
Muyeye	*Securidaca longepedunculata* FRESEN	Polygalaceae
Ngaï-ngaï	*Hibiscus sabdariffa* L.	Malvaceae
Pili-pili	*Capsicum frutescens* L.	Solanaceae
Shama	*Arachis hypogaea* L.	Papilionaceae
Sokontwe	*Bidens pilosa* L.	Compositae
Tomato	*Solanum lycopersicum* MÜLLER	Solanaceae
Tute	*Manihot esculenta* KRANTZ	Euphorbiaceae

BIBLIOGRAPHIE

1. Bernier G. — L'aire de dispersion du genre *Eminia* (munkoyo) et l'origine de son utilisation chez les Bantus, *Bull. Acad. Roy. Belg.*, 5e série, 46, 8, 1960.
2. Bernier G. et Lambrechts A. — Etude sur les boissons fermentées indigènes du Katanga, *Acad. Roy. Sc. Col.*, Mém. in 8°, **IX**, 7, 1959.
3. Bervoets W. et Lassance M. — Modes et coutumes alimentaires des Congolais en milieu rural, *Acad. Roy. Sc. Col.*, Mém. in 8°, **IX**, 4, 1959
4. De Wildeman E. et Staner P. — Contribution à l'étude de la flore du Katanga, Bruxelles, 1927-1933.
5. De Wildeman E. — Documents pour l'étude de l'alimentation végétale de l'indigène au Congo Belge, Bruxelles, Hayez, 1934.
6. De Wildeman E. — A propos de médicaments indigènes congolais, Bruxelles, G. Van Campenhout, 1935.
7. Duvigneaud P. et Dewit J. — Les « Mufungu » *(Anisophyllea)* des steppes et forêts claires du Congo méridional, *Bull. Inst. Roy. Col. Belge*, **XXI**, 4, 1950.
8. Gillardin J. — Les essences forestières du Congo Belge et du Ruanda-Urundi. Leurs dénominations indigènes, leur distribution et leur habitat, *Public. de la Direction de l'Agriculture, des Forêts et de l'Elevage*, Bruxelles, 1959.
9. Grévisse F. — Notes ethnographiques relatives à quelques populations autochtones du Haut-Katanga industriel, *Bull. Trim. C.E.P.S.I.*, **32**, 65-210, 1956.
10. I.N.E.A.C. — Flore du Congo Belge et du Ruanda-Urundi : Spermatophytes, Bruxelles, 1948-1960.
11. Irvine F.R. — Food plants of west Africa, *Lejeunia*, **16**, 27-51, 1952.
12. Lebrun J. — Les espèces congolaises du genre *Ficus* L., *Mém. Inst. Roy. Col. Belge*, in 8°, **III**, 1934.
13. Nicholls L. — Tropical nutrition and dietetics, 3e Ed., Ballière et Cie, London, 1951.

14. Poot A. — Le munkoyo, boisson des indigènes Bapende (Katanga), *Bull. Inst. Roy. Col. Belge*, **XXV**, 1, 1954.

15. Robyns W. — Les espèces du genre *Securidaca* du Congo Belge, *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.*, **LX**, 88-93, 1927.

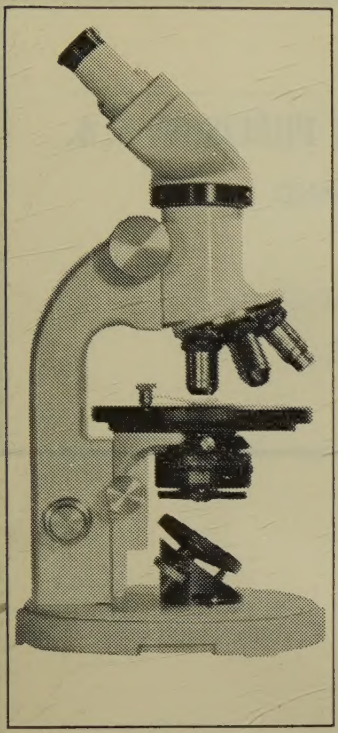
16. Schnell R. — Plantes alimentaires et vie agricole de l'Afrique noire, Larose, Paris, 1957.

17. R. P. de Sousberghe S. J. — Le suicide chez les Bapende, *Bull. Inst. Roy. Col. Belge*, **XXV**, I, 1954.

18. Staner P. — Plantes congolaises à fruits comestibles, *Publ. I. N. E. A. C.*, Sér. Sci., **4**, 1935.

19. Thomson B. P. — Two studies in African nutrition, Manchester University Press, 1954.

20. Wilbaux R. — Composition et propriétés toxiques des graines et des feuilles de *Tephrosia vogelii* Hook, *Rev. Bot. Appl. Agric. Trop.*, **14**, 160, 1934.



Wild M 11

Un microscope moderne

C'est un microscope à usage multiple. Il est indispensable aux étudiants en médecine ou en sciences naturelles. Il a sa place dans un laboratoire; il est utilisé avec profit pour les cours pratiques et pour la démonstration de préparations microscopiques.

Cet instrument de précision d'origine Suisse est pourvu d'un système optique de haute qualité, fabriqué par Wild Heerbrugg S.A. Pendant le transport un capuchon métallique empêche tout dommage.

WILD
HEERBRUGG

Agents généraux :

Ets
VAN HOPPLYNUS
S. A.

101, rue Royale
BRUXELLES 1
Tél. 18.12.60 (3 lignes)

NARITA

Matériel pour
laboratoire
et
prise de vues
photo-ciné

19, Place Rouppe
Bruxelles 1
Tél. 02/12.98.30

COPIMATIC

94, avenue Fonsny
Bruxelles 6
Tél. 38.15.23

la photographie,
la photocopie et
le microfilm dans
toutes leurs applications

SOCIÉTÉ BELGE
D'OPTIQUE ET D'INSTRUMENTS DE PRÉCISION S. A.

108, rue de la Prairie, GAND

Représentations exclusives de : Beckman Instruments Inc.
LKB Produkter.
Southern Analytical Ltd.
W. T. W.

C. REYNIERS

83, rue Maes, BRUXELLES 5. Tél. 47.10.05

1. **APPAREILS** : Electrothermie - Agitation - Centrifugation - Manipulation et Protection contre les rayonnements - Boîtes à gants - Mobilier.

2. **PRODUITS** : Réactifs, produits de recherches biochimiques - Eléments purs - Produits sur commande.